

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Toxicología y Farmacología



TESIS DOCTORAL

Caracterización farmacológica y funcional de los receptores nicotínicos de las células cromafines de la médula adrenal de la rata: plasticidad inducida por un modelo de estrés crónico

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Diego Bustillo Merino

DIRECTORES

Antonio R. Artalejo
Luis Alcides Olivos Oré

Universidad Complutense de Madrid

Facultad de Veterinaria

Departamento de Toxicología y Farmacología



Caracterización farmacológica y funcional de los receptores nicotínicos de las células cromafines de la médula adrenal de la rata: plasticidad inducida por un modelo de estrés crónico

Memoria de tesis para optar al Grado de Doctor

Diego Bustillo Merino

DIRECTORES

**Dr. Antonio R. Artalejo
Dr. Luis Alcides Olivos Oré**



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
Facultad de Veterinaria
Departamento de Toxicología y Farmacología

D. Antonio Rodríguez Artalejo y D. Luis Alcides Olivos Oré, Catedrático y Profesor Ayudante Doctor, respectivamente, de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid,

CERTIFICAN:

Que D. Diego Bustillo Merino, ha realizado bajo su dirección, en el Departamento de Toxicología y Farmacología de la Facultad de Veterinaria Madrid el presente trabajo de investigación titulado "Caracterización farmacológica y funcional de los receptores nicotínicos de las células cromafines de la médula adrenal de la rata: plasticidad inducida por un modelo de estrés crónico " como trabajo de Tesis para optar al Grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid.

Madrid, 9 de septiembre de 2015

Fdo.: D. Antonio Rodríguez Artalejo

Fdo.: D. Luis A. Olivos Oré

Me gustaría dedicar esta tesis a mi familia, especialmente a mis padres, ya que sin su esfuerzo no hubiera podido llegar hasta aquí.

Y también a Natalia, sin tu apoyo no hubiera podido aguantar este largo esfuerzo.

Agradecimientos

A lo largo de estos años (que han sido unos cuantos) son muchas las personas a las que me gustaría agradecer su ayuda, de una u otra manera, en la realización de esta tesis doctoral así como en mi formación en el ámbito de la investigación básica.

Principalmente, a Antonio R. Artalejo, que fue la persona que confió en mí para llevar a cabo este proyecto y me inició en el mundo de la investigación. Además de transmitirme sus amplios conocimientos en diversas materias y su pasión por la ciencia, siempre se ha mostrado dispuesto a ofrecerme ayuda y consejo cuando lo he necesitado.

A todos mis compañeros de laboratorio que he tenido a lo largo de estos años (Gema, Yolanda, Marina) con los que he compartido algunas “alegrías laborales” pero que sobre todo me han ayudado a superar los frecuentes obstáculos que las células, las pipetas, el amplificador, el incubador, el ordenador XP,... ponen en la senda del investigador que se inicia y también del muy experimentado. A Jesús Sánchez Nogueiro, que con notable esfuerzo y aún mayor habilidad puso a punto el cultivo de las neuronas de los ganglios espinales. Es todo un ejemplo de buen hacer y saber estar.

Y, especialmente, a Luis y a Mariví, mis dos “hermanos mayores”, que además de enseñarme los secretos y trucos –aquellos que no aparecen en los materiales y métodos de los artículos– me inculcaron buenos modales –algunos dirían buenas prácticas– en el laboratorio, y, lo que es más importante en el mundo universitario, en el que lo laboral y lo personal se entremezclan de forma única en cada Departamento.

A todas las personas que componen la Unidad de Farmacología: Casilda, Fernando, Julio, Manolo, Mara y Mariló, por su apoyo y amistad; y a Jose y Mariano, que han mimado a nuestros animales para que siempre tuviéramos las mejores células; y a mis “compañeros de comedor”: Juanan, Teresa y Txema, por su amistad, manifestada tanto en los buenos (la mayoría) como en los malos momentos y que ha sido fuente de todo tipo de enseñanzas gracias, entre otras cosas, a nuestras profundas charlas “científicas”.

A M^a Teresa Miras-Portugal y toda la gente del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, con la cual he trabajado en diversas y exitosas ocasiones. Deseo, en particular, mencionar a Rosa Gómez Villafuertes que con suma eficacia y amabilidad ha llevado a cabo el genotipado de los ratones $\alpha 9$ KO empleados en este trabajo.

Y a todos aquellos que no menciono.

Muchas gracias a todos!!!

Este trabajo ha sido desarrollado en el marco de los Proyectos de Investigación BFU2005-06034BFI, BFU2011-26253 y CSD2008-00005 del Gobierno de España y gracias a una beca de Formación de Personal Investigador concedida por el Gobierno del País Vasco.

ÍNDICE

ÍNDICE	5
ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS	11
ABREVIATURAS	19
RESUMEN	25
SUMMARY	29
I. INTRODUCCIÓN	33
1.1. LOS nAChRs: PROTOTIPO DE CANALES IÓNICOS ACTIVADOS POR LIGANDO DE LA FAMILIA Cys-loop	33
1.1.1. Estructura de los nAChRs	36
1.1.1.1. El dominio extracelular	38
1.1.1.2. El dominio transmembrana	43
1.1.1.3. El dominio citosólico	43
1.1.1.4. El poro iónico	44
1.1.2. Síntesis, ensamblaje y regulación de la expresión de los nAChRs	46
1.1.3. Los nAChRs neuronales	50
1.1.3.1. Características farmacológicas de los nAChRs neuronales	51
1.1.3.2. Significado funcional de los nAChRs neuronales	53
1.2. LOS nAChRs $\alpha 9^*$ Y $\alpha 10^*$	56
1.2.1. Función del nAChR $\alpha 9\alpha 10$ en las células ciliadas de la cóclea	62
1.2.2. Implicaciones fisiopatológicas del nAChR $\alpha 9^*$	65
1.3. LOS nAChRs $\alpha 7$	67
1.4. LA GLÁNDULA ADRENAL	69
1.4.1. Morfología de la glándula adrenal	69
1.4.1.1. La corteza adrenal	69
1.4.1.1.1. Zona glomerulosa	70
1.4.1.1.2. Zona fasciculada	71
1.4.1.1.3. Zona reticular	72
1.4.1.2. La médula adrenal	72
1.4.1.3. Biosíntesis de las catecolaminas	75
1.4.2. Propiedades eléctricas y canales iónicos de las células cromafines	76
1.4.2.1. Propiedades eléctricas pasivas de la membrana celular	76
1.4.2.2. El potencial de membrana en reposo y relación corriente-voltaje	77
1.4.2.3. El potencial de acción	78
1.4.2.4. Canales iónicos activados durante el potencial de acción	78
1.4.2.4.1. Canales de Na^+	78
1.4.2.4.2. Canales de Ca^{2+}	79
1.4.2.4.3. Canales de K^+	79
1.4.2.5. Canales de K^+ de las células cromafines	80
1.4.2.5.1. Canales de K^+ dependientes de voltaje	80
1.4.2.5.2. Canales de K^+ dependientes de Ca^{2+}	81
1.4.2.6. Los nAChRs de las células cromafines de la médula adrenal	82
1.4.2.7. Los nAChRs y el potencial de membrana de la célula cromafín	85
1.4.3. Acoplamiento excitación-secreción en las células cromafines	86

1.5. TRANSMISIÓN SINÁPTICA EN LOS GANGLIOS AUTÓNOMOS Y EN LA MÉDULA ADRENAL	87
1.5.1. La transmisión ganglionar	87
1.5.1.1. nAChRs implicados en la transmisión ganglionar	91
1.5.2. La transmisión en la médula adrenal	92
1.5.2.1. Organización anatómico-funcional de la médula adrenal	94
1.5.2.2. La neurotransmisión en la unión esplacno-cromafín	95
1.6. LA GLÁNDULA ADRENAL Y EL ESTRÉS	96
1.6.1. El estrés	96
1.6.1.1. Evolución del concepto de estrés	97
1.6.1.2. Síndrome general de adaptación y alostasia	98
1.6.1.3. Vías y mecanismos de la respuesta de estrés	105
1.6.1.3.1. Vías aferentes	105
1.6.1.3.2. Vías eferentes	106
1.6.1.3.3. Centros integradores	107
1.6.1.3.4. Mecanismos efectores	108
1.6.1.4. Estrés crónico: fenómenos adaptativos	109
1.6.1.5. El estrés por frío	111
1.6.1.6. Plasticidad de la médula adrenal durante el estrés	113
1.6.1.6.1. Modificaciones en la en la sinapsis esplacno-cromafín	114
1.6.1.6.2. Modificaciones en la comunicación intercelular mediada por uniones en hendidura	115
1.6.1.6.3. Modificaciones de los canales iónicos de la membrana de las células cromafines	118
II. PLANTEAMIENTOS Y OBJETIVOS	123
III. MATERIALES Y MÉTODOS	127
3.1. MATERIALES Y EQUIPOS	127
3.1.1. Material Biológico	127
3.1.2. Material fungible /cultivos celulares, registros electrofisiológicos y determinaciones de catecolaminas)	128
3.1.3. Equipos	129
3.1.3.1. Instrumentación general	129
3.1.3.2. Cultivos celulares (células cromafines y neuronas del ganglio de la raíz dorsal) y cortes de la glándula adrenal de rata y de ratón	129
3.1.3.3. Registro electrofisiológico	130
3.1.3.4. Inmunocitoquímicas	131
3.1.3.5. Microscopía de fluorescencia funcional	131
3.1.4. Programas informáticos	131
3.1.5. Reactivos y productos químicos	131
3.2. MÉTODOS	133
3.2.1. Cultivo primario de células cromafines de la médula adrenal de la rata	133
3.2.2. Preparación de cortes de la glándula adrenal de rata y ratón	135
3.2.3. Cultivo primario de neuronas de los ganglios de las raíces dorsales de la médula espinal de la rata	136

3.2.4. Protocolo de estrés por frío	137
3.2.5. Fijación de voltaje en parches de membrana (<i>Patch-clamp</i>)	137
3.2.5.1. Registro de corrientes iónicas y del potencial de membrana con la técnica de patch-clamp en células cromafines aisladas y neuronas del ganglio de la raíz dorsal de la rata	140
3.2.5.2. Registro de corrientes iónicas y del potencial de membrana en cortes de la glándula adrenal de rata y de ratón	142
3.2.5.3. Administración de fármacos	143
3.2.5.4. Estimulación eléctrica de campo	143
3.2.6. Marcaje inmunocitoquímico de los nAChRs en células cromafines de rata y de ratón y en células de los ganglios dorsales de la rata	144
3.2.7. Determinación fluorométrica de la concentración citosólica de Ca^{2+} en células de los ganglios de las raíces dorsales de la rata	145
3.2.8. Determinación del contenido de catecolaminas de las glándulas adrenales de rata	146
3.2.9. Análisis de la interacción de antagonistas nicotínicos	147
3.2.10. Análisis estadístico	150
VI. RESULTADOS	153
4.1. ESTUDIO DE LA SELECTIVIDAD FARMACOLÓGICA DE LA α-CONOTOXINA RgIA	153
4.1.1. Efecto de la α -conotoxina RgIA sobre los nAChRs $\alpha 7$ de las células cromafines de la médula adrenal de rata	153
4.1.2. Efecto de la α -conotoxina RgIA sobre las corrientes nicotínicas de las células cromafines en cortes de la glándula adrenal de ratones $\alpha 9$ KO .	154
4.1.3. Efecto de la α -conotoxina RgIA sobre las corrientes nicotínicas de las neuronas de los ganglios de las raíces dorsales de la médula espinal de la rata .	160
4.1.4. Efecto de la α -conotoxina RgIA sobre las corrientes de Ca^{2+} , Na^+ y K^+ dependientes de voltaje y los canales SK de las células cromafines de la médula adrenal de la rata	164
4.1.5. Efecto de la α -conotoxina RgIA y del baclofeno sobre las corrientes de Ca^{2+} dependientes de voltaje de las neuronas de los ganglios de las raíces dorsales de la médula espinal de la rata	170
4.2. EFECTO DEL FRÍO SOBRE EL PESO CORPORAL, EL TAMAÑO Y EL CONTENIDO DE CATECOLAMINAS DE LA GLÁNDULA ADRENAL DE LA RATA	171
4.3 CARACTERIZACIÓN FARMACOLÓGICA DE LOS nAChRs DE LAS CÉLULAS CROMAFINES DE LA MÉDULA ADRENAL DE LA RATA: PLASTICIDAD INDUCIDA POR ESTRÉS	173
4.3.1. Efecto del estrés por frío sobre los nAChRs de las células cromafines aisladas de la rata	173
4.3.2. Caracterización farmacológica de nuevos nAChRs heteroméricos en las células cromafines aisladas de la rata	186
4.3.3. Caracterización farmacológica de los nAChRs de las células cromafines de rata en cortes de la glándula adrenal de animales control y sometidos a un modelo experimental de estrés por frío	191
4.3.4. Caracterización farmacológica de los nAChRs de las terminaciones del nervio esplácnico en cortes de la glándula adrenal de animales sometidos a un modelo experimental de estrés por frío ¡Error! Marcador no definido.	195

4.4. LA ESTIMULACIÓN ELÉCTRICA DE CAMPO EN CORTES DE LA GLÁNDULA ADRENAL DE RATA	198
4.5. ACOPLAMIENTO FUNCIONAL ENTRE LOS nAChRs $\alpha 9\alpha 10$ y LOS CANALES SK	205
4.5.1. Identificación de los canales SK en células cromafines en cortes de la glándula adrenal de rata	205
4.5.2. Contribución de los canales SK a la actividad eléctrica de las células cromafines en cortes de la glándula adrenal de rata	208
4.5.2.1. Potencial de membrana en reposo y actividad eléctrica espontánea	208
4.5.2.2. Actividad eléctrica inducida por la inyección de corriente	210
4.5.2.2.1. Estímulo eléctrico	210
4.5.2.2.2. Estímulo farmacológico	212
4.5.2.3. Actividad eléctrica inducida por la estimulación del nervio esplácnico	213
4.5.2.3.1. EPSPs	213
4.5.2.3.2. EPSCs	215
4.5.3. Efecto de la α -conotoxina RgIA sobre la actividad eléctrica de las células cromafines en cortes de glándula adrenal de rata	216
4.5.3.1. Descarga de potenciales de acción inducida por la administración de ACh exógena	216
4.5.3.2. Actividad eléctrica inducida por la estimulación del nervio esplácnico	219
V. DISCUSIÓN	227
5. 1. ANÁLISIS DE LA SELECTIVIDAD FARMACOLÓGICA DE LA α-RgIA	227
5.2. CARACTERIZACIÓN FARMACOLÓGICA DE LOS nAChRs DE LAS CÉLULAS CROMAFINES DE LA MÉDULA ADRENAL DE LA RATA: PLASTICIDAD INDUCIDA POR EL FRÍO	233
5. 3. SIGNIFICADO FUNCIONAL DE LOS nAChRs $\alpha 9^*$ y/o $\alpha 10^*$: ACOPLAMIENTO CON LOS CANALES SK	239
VI. CONCLUSIONES	245
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	249
ANEXOS	279

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

FIGURAS	Pág.
Figura 1.1. Estructura del nAChR del órgano eléctrico del pez <i>Torpedo</i>	35
Figura 1.2. Estructura secundaria de una subunidad de los nAChRs.	35
Figura 1.3. Representación bidimensional del nAChR del pez <i>Torpedo marmorata</i> obtenida mediante microscopía electrónica de alta resolución	36
Figura 1.4. Estructura de la AChBP de <i>Lymnaea stagnalis</i> determinada mediante difracción de rayos X	37
Figura 1.5. Estructura del dominio extracelular de la subunidad $\alpha 1$ de los nAChRs	39
Figura 1.6. Sitio de unión a los fármacos agonistas del nAChR muscular del pez <i>Torpedo</i>	40
Figura 1.7. Interacción de ligandos competitivos de los nAChRs con la AChBP	41
Figura 1.8. Sección longitudinal del dominio extracelular del nAChR del <i>Torpedo</i>	42
Figura 1.9. Estructura del dominio transmembrana de una subunidad α del nAChR del pez <i>Torpedo</i>	43
Figura 1.10. Representación tridimensional del dominio citosólico (vestíbulo interno) del nAChR del pez <i>Torpedo</i>	44
Figura 1.11. Síntesis y tráfico de las proteínas de membrana	48
Figura 1.12. Farmacología de los nAChRs neuronales	52
Figura 1.13. Árbol filogenético de las 17 subunidades conocidas de los nAChRs	58
Figura 1.14. Imagen del dominio extracelular del nAChR $\alpha 9\alpha 10$ y del complejo formado la α -RgIA	61
Figura 1.15. Representación esquemática de un corte sagital del órgano de Corti de la cóclea	63
Figura 1.16. Transducción de las señales acústicas por las células ciliadas de la cóclea	65
Figura 1.17. Rutas biosintéticas de los corticosteroides	70
Figura 1.18. Anatomía e histología de la glándula adrenal	71
Figura 1.19. Representación esquemática de una célula cromafín innervada por la terminación nerviosa de una fibra del nervio esplácnico (de color amarillo)	73
Figura 1.20. Ruta biosintética de las CAs	76
Figura 1.21. Etapas del ciclo de las vesículas secretoras inmediatamente anteriores y posteriores a la exocitosis	86
Figura 1.22. Patrones de innervación de las neuronas ganglionares en los ganglios autónomos	88
Figura 1.23. Transmisión sináptica en el ganglio simpático de la rana	90
Figura 1.24. Patrón de descarga de potenciales de acción de las neuronas preganglionares (NPS) que innervan las células cromafines adrenérgicas o noradrenérgicas en respuesta a la estimulación eléctrica del núcleo ventrolateral rostral del gato	93
Figura 1.25. Fases del síndrome general de adaptación.	99
Figura 1.26. Efectos de la activación del SNA	100
Figura 1.27. Respuesta del eje HPA y del SNA al estrés	101
Figura 1.28. Alostasia y carga alostásica	103
Figura 1.29. Diagrama de bloques de la organización central y periférica de la respuesta de estrés en la rata	108
Figura 1.30. Plasticidad de la comunicación intercelular en la médula adrenal	116
Figura 1.31. Efecto de la comunicación intercelular a través de uniones en hendidura sobre la secreción de CAs por la médula adrenal	117

Figura 1.32. Registros de trenes de potenciales de acción generados por la inyección de corriente en células cromafines procedentes de ratas control (panel izquierdo) y en células cromafines de animales hipofisectomizados (panel derecho)	119
Figura 3.1. Herramientas empleadas para la generación de los ratones $\alpha 9$ KO de la cepa CBA CaJ	128
Figura 3.2. Vibratomo Integraslice	130
Figura 3.3. Cultivo primario de células cromafines de la médula adrenal de la rata. Imagen de microscopía de campo claro (400x)	135
Figura 3.4. Imagen de la superficie de un corte de la glándula adrenal de la rata (630x)	136
Figura 3.5. Configuraciones de la técnica de <i>patch-clamp</i>	140
Figura 3.6. Imagen de un corte de la glándula adrenal de rata durante un experimento electrofisiológico en el que se combinaba la estimulación eléctrica de campo con la administración de fármaco	144
Figura 4.1. Efecto de la α -BgTx y de la α -RgIA sobre las corrientes iónicas inducidas por PNU282987 en células cromafines de rata incubadas con PNU120596, un modulador alostérico de los nAChRs $\alpha 7$	154
Figura 4.2. Inmunolocalización de las subunidades $\alpha 7$, $\alpha 9$ y $\alpha 10$ en células cromafines de ratón y rata en cultivo	155
Figura 4.3. Efecto de la α -RgIA sobre las corrientes inducidas por ACh, Cho u Oxo-M en células cromafines en cortes de la glándula adrenal de ratones $\alpha 9$ KO y sus controles	157
Figura 4.4. Efecto de la α -ArIB sobre las corrientes nicotínicas de las células cromafines en cortes de la glándula adrenal de ratón	159
Figura 4.5. Efecto del PNU282987, en ausencia o en presencia de PNU120596, sobre las corrientes de la membrana de las células cromafines en cortes de la glándula adrenal de ratón	159
Figura 4.6. Efecto de la administración conjunta de α -ArIB y α -RgIA sobre las corrientes nicotínicas de las células cromafines en cortes de la glándula adrenal de ratón	160
Figura 4.7. Inmunolocalización de las subunidades $\alpha 7$, $\alpha 9$ y $\alpha 10$ en neuronas de los ganglios de las raíces dorsales de la médula espinal de la rata en cultivo	161
Figura 4.8. Caracterización funcional de neuronas DRG de rata	162
Figura 4.9. Oclusión recíproca de los efectos bloqueantes de la α -RgIA y de la α -ArIB sobre las corrientes inducidas por ACh en neuronas DRG de rata	164
Figura 4.10. Efecto de la α -RgIA sobre los canales Cav de las células cromafines aisladas de la médula adrenal de la rata	166
Figura 4.11. Efecto de la α -RgIA sobre las corrientes de Na^+ y K^+ activadas por la despolarización de la membrana de las células cromafines aisladas de la médula adrenal de rata	167
Figura 4.12. Efecto de la α -RgIA sobre los canales SK de la membrana de las células cromafines aisladas de la glándula adrenal de la rata	168
Figura 4.13. Efecto del baclofeno sobre los canales Cav y los nAChRs de las células cromafines aisladas de la médula adrenal de la rata	170
Figura 4.14. Efecto de la α -RgIA y del baclofeno sobre los canales Cav de las neuronas DRG de rata	171
Figura 4.15. Efecto del estrés por frío (4 °C, 5 días) sobre el peso y el contenido en CAs de las glándulas adrenales de la rata	173
Figura 4.16. Corrientes iónicas inducidas por la administración consecutiva de ACh y RJR 2403 en una célula cromafín aislada de la médula adrenal de la rata.	174

Figura 4.17. Corrientes iónicas inducidas por la administración de ACh, Nic y Oxo-M en células cromafines de rata procedentes de animales sometidos a un protocolo de estrés por frío y sus controles	175
Figura 4.18. Corrientes iónicas inducidas por la administración de ACh en células cromafines en cortes de la glándula adrenal de ratas sometidas a un protocolo de estrés por frío y sus controles	176
Figura 4.19. Efecto de la α -MII sobre las corrientes inducidas por ACh, Nic y Oxo-M en células cromafines de rata procedentes de animales sometidos a un protocolo de estrés por frío y sus controles	178
Figura 4.20. Efecto de la α -AuIB sobre las corrientes inducidas por ACh y Nic en células cromafines de rata procedentes de animales sometidos a un protocolo de estrés por frío y sus controles	180
Figura 4.21. . Efecto de la α -ArIB sobre las corrientes inducidas por ACh, Nic y Oxo-M en células cromafines de rata procedentes de animales sometidos a un protocolo de estrés por frío y sus controles	181
Figura 4.22. Efecto de la α -RgIA sobre las corrientes inducidas por ACh, Nic y Oxo-M en células cromafines de rata procedentes de animales sometidos a un paradigma de estrés por frío y sus controles	183
Figura 4.23. Efecto de la MLA sobre las corrientes inducidas por ACh, Nic y Oxo-M en células cromafines de rata procedentes de animales sometidos a un protocolo de estrés por frío y sus controles	185
Figura 4.24. Oclusión de los efectos de la α -ArIB y la α -RgIA sobre las corrientes inducidas por ACh en células cromafines de rata procedentes de animales sometidos a un protocolo de estrés por frío y sus controles	188
Figura 4.25. Efecto de la administración consecutiva y acumulativa de MLA, α -MII y α -AuIB sobre las corrientes inducidas por ACh en células cromafines de la glándula adrenal de rata procedentes de animales sometidos a un protocolo de estrés por frío y sus controles	190
Figura 4.26. Efecto de la administración consecutiva y acumulativa de α -AuIB y α -MII sobre las corrientes inducidas por ACh en células cromafines de la glándula adrenal de rata procedentes de animales sometidos a un protocolo de estrés por frío y sus controles	191
Figura 4.27. Corrientes iónicas inducidas por PNU282987 en células cromafines en cortes de glándulas adrenales procedentes de ratas sometidas a un protocolo de estrés por frío	192
Figura 4.28. Efecto de la α -ArIB sobre las corrientes inducidas por ACh en células cromafines en cortes de glándulas adrenales procedentes de animales sometidos a un protocolo de estrés por frío y sus controles	193
Figura 4.29. Efecto de la α -RgIA sobre las corrientes inducidas por ACh en células cromafines en cortes de glándulas adrenales procedentes de animales sometidos a un protocolo de estrés por frío y sus controles	194
Figura 4.30. Efecto de la administración conjunta de α -RgIA y α -ArIB sobre las corrientes inducidas por ACh en células cromafines en cortes de glándulas adrenales procedentes de animales sometidos a un protocolo de estrés por frío	195
Figura 4.31. Efecto de la administración conjunta de α -RgIA y α -ArIB sobre las sEPSCs en células cromafines en cortes de la glándula adrenal de animales sometidos a un protocolo de estrés por frío	196
Figura 4.32. Efecto de la administración de PNU120596 sobre las sEPSCs en células cromafines en cortes de la glándula adrenal procedentes de animales sometidos a un protocolo de estrés por frío	197

Figura 4.33. Efecto de la estimulación eléctrica de campo bifásica (± 50 V, 50 μ s en cada fase) sobre el potencial de membrana de una célula cromafín en un corte de la glándula adrenal de la rata	198
Figura 4.34. Efecto de la TTX y de la d-tubocurarina sobre las respuestas inducidas por la inyección de corriente, la aplicación de pulsos de voltaje o la estimulación eléctrica de campo en células cromafines en cortes de la glándula adrenal de rata	200
Figura 4.35. Relación entre la intensidad de la estimulación eléctrica de campo y la amplitud de las EPSCs registradas en células cromafines en cortes de la glándula adrenal de rata	201
Figura 4.36. Efecto de la frecuencia de la estimulación eléctrica de campo sobre la amplitud y probabilidad de aparición de EPSCs de las células cromafines en cortes de la glándula adrenal de la rata	203
Figura 4.37. Efecto de la frecuencia de la estimulación eléctrica sobre la amplitud y probabilidad de aparición de EPSPs de las células cromafines en cortes de la glándula adrenal de la rata	205
Figura 4.38. Corrientes iónicas activadas por la despolarización de la membrana de las células cromafines en cortes de la glándula adrenal de la rata	207
Figura 4.39. Efecto de la apamina sobre la actividad eléctrica espontánea de las células cromafines en cortes de la glándula adrenal de rata	208
Figura 4.40. Efecto de la apamina sobre la amplitud de la AHP de los potenciales de acción espontáneos de las células cromafines en cortes de la glándula adrenal de rata	209
Figura 4.41. Efecto de apamina sobre la duración al 50% de la amplitud máxima de la AHP de los potenciales de acción espontáneos de las células cromafines en cortes de la glándula adrenal de rata	210
Figura 4.42. Efecto de la apamina sobre el patrón de descarga de potenciales de acción inducidos por la inyección de corriente en células cromafines en cortes de la glándula adrenal de rata	212
Figura 4.43. Efecto de la apamina sobre el patrón de descarga de potenciales de acción inducidos por la administración de ACh a células cromafines en cortes de la glándula adrenal de rata	213
Figura 4.44. Efecto de la apamina sobre los EPSPs inducidos por la estimulación eléctrica (± 50 V; 50 μ s por fase) del nervio esplácnico en células cromafines en cortes de la glándula adrenal de rata	214
Figura 4.45. Efecto de la apamina sobre las EPSCs inducidas por la estimulación eléctrica del nervio esplácnico (± 50 V; 50 μ s por fase) en células cromafines en cortes de la glándula adrenal de rata	216
Figura 4.46. Efecto de la α -RgIA sobre las corrientes de Na^+ y de K^+ activadas por la despolarización de la membrana de las células cromafines en cortes de la glándula adrenal de la rata	218
Figura 4.47. Efecto de la α -RgIA sobre el patrón de descarga de potenciales de acción inducido por la administración de ACh a una célula cromafín en un corte de la glándula adrenal de rata	219
Figura 4.48. Efecto de la α -RgIA sobre las EPSCs de las células cromafines inducidas por la estimulación eléctrica del nervio esplácnico en cortes de la glándula adrenal de la rata	220
Figura 4.49. Efecto de la α -RgIA sobre las EPSCs y los EPSPs inducidos por la estimulación eléctrica del nervio esplácnico en células cromafines en cortes de la glándula adrenal de rata	222

Figura 4.50. Efecto de la administración consecutiva de apamina y α -RgIA sobre las EPSCs inducidas eléctricamente en células en cortes de la glándula adrenal de animales sometidos a un protocolo de estrés por frío	223
Figura 5.1. Composición relativa de los nAChRs de las neuronas DRG de la rata	230
Figura 5.2. Composición relativa de los nAChRs de las células cromafines de ratón	231
Figura 5.3. Porcentajes de inhibición de la corriente inducida por ACh producidos por diferentes antagonistas nicotínicos en células cromafines de rata procedentes de animales control y sometidas a un protocolo de estrés por frío	236

TABLAS	Pág.
Tabla 1.1. Permeabilidades iónicas relativas del nAChR de la unión neuromuscular de la rana	46
Tabla 1.2. Subunidades que forman los nAChRs neuronales: funciones y principales localizaciones	54
Tabla 1.3. Efectos físicos, químicos, psicológicos, sociales, cardiovasculares y metabólicos producidos por diferentes estresores	104
Tabla 1.4. Respuesta hormonal a diferentes estresores	105
Tabla 3.1. Relación de compuestos y reactivos	132
Tabla 3.2. Composición de la solución salina de Hank	133
Tabla 3.3. Composición del medio de Eagle modificado por Dulbecco	134
Tabla 3.4. Composición de la solución INC	137
Tabla 3.5. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados en los experimentos de inmunocitoquímica	145

ABREVIATURAS

A	Adrenalina
ACh	Acetilcolina
AChBP	Proteína de unión a la acetilcolina; <i>acetylcholine binding protein</i>
ACTH	Hormona corticotrópica (corticotropina)
ACV1	Conotoxina Vc1.1
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AHP	Posthiperpolarización
AMPc	Adenosin Monofosfato cíclico
AMPA	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propiónico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATP	Adenosin trifosfato
ATP.Na ₂	Sal sódica del trifosfato de adenosina
ATR	Atropina
ATV	Área tegmental ventral
AVP	Arginina-vasopresina
BK	Canales de K ⁺ dependientes de Ca ²⁺ de elevada conductancia iónica
Ca _v	Canales de Ca ²⁺ dependientes de voltaje
CaMKII	Proteína quinasa dependiente de Ca ²⁺ y calmodulina
CE ₅₀	Concentración efectiva 50
CGRP	Péptido relacionado con el gen de la calcitonina
Cho	Colina
CI ₅₀	Concentración inhibidora 50
CICR	Liberación de Ca ²⁺ inducida por Ca ²⁺
Cit	Citisina
CORT	Corticosterona
CRH	Hormona liberadora de corticotropina
CYP11A1	Citocromo P450 20,22 desmolasa
DBH	Dopamina- β -hidroxilasa
DH β E	Dihidro- β -eritroidina
DMEM	Medio de cultivo de Eagle modificado por Dulbecco
DMPP	Dimetilfenilpiperazinio
DOPA	Dihidroxifenilalanina
DPOE	emisiones otoacústicas por producto de distorsión; <i>distortion product otoacoustic emissions</i>
DRG	Ganglios de la raíces dorsales; <i>dorsal root ganglia</i>
Egr-1	Proteína respuesta temprana a crecimiento; <i>Early growth response</i>

EGTA	Ácido etilenglicol-bis(2-aminoetileter)-N,N,N',N'-tetraacético
E_K	Potencial de equilibrio del K^+
EPIB	Epibatidina
EPSC	Corriente excitadora postsináptica; <i>excitatory postsynaptic current</i>
EPSP	Potenciales sinápticos excitadores; <i>excitatory postsynaptic potentials</i>
sEPSC	Corrientes excitadoras postsinápticas espontáneas; <i>spontaneous excitatory postsynaptic currents</i>
fEPSP	Potencial sináptico excitador rápido; <i>fast excitatory postsynaptic potential</i>
sEPSP	Potencial sináptico excitador lento; <i>slow excitatory postsynaptic potential</i>
lsEPSP	Potencial sináptico lento de larga duración; <i>late slow excitatory postsynaptic potential</i>
E_r	Potencial de reversión experimental
E_{rev}	Potencial de reversión corregido por el potencial de difusión
ERG	<i>Ether-a-go-go-related gene</i>
ERK	Proteína cinasas reguladas extracelularmente
ES	Potencial de la solución externa
ESM	Error estándar de la media
EST	Estricnina
FK	Canal de K^+ dependiente de voltaje rápido; <i>fast-K</i>
FRET	Transferencia de energía mediante resonancia
GABA	Ácido gama aminobutírico
GC	Glucocorticoides
GH	Hormona del crecimiento
GluR2	Receptores de glutamato tipo 2
GR	Glucocorticoides
GTP	Trifosfato de guanosina
GTS-21	3-(2,4-dimetoxibencilideno) anabaseína
HEK	(Células) embrionarias del riñón humano (<i>Human Embryonic Kidney</i>)
HEPES	N-hidroxietilpiperazina-N-etanosulfonato
HPA	Hipotálamo-hipófisis-corteza suprarrenal
I_{ACh}	Corriente inducida por acetilcolina
$I_{Ca^{2+}}$	Corriente de Ca^{2+} dependientes de voltaje
I_{Nic}	Corriente inducida por nicotina

I _{Oxo-M}	Corriente inducida por Oxotremorina-M
IP ₃	Inositol 1,4,5-trifosfato
I _{tardia}	Componente tardío de las corriente excitadora postsináptica
IPSP	Potencial postsináptico inhibitor; <i>inhibitory postsynaptic potential</i>
sIPSP	Potencial postsináptico inhibitor lento; <i>slow inhibitory postsynaptic potential</i>
K _D	Constante de disociación
KO	<i>Knockout</i>
K _v	Canales de K ⁺ dependientes de voltaje
LAAD	L-aminoácido-aromático descarboxilasa
LC	<i>Locus coeruleus</i>
L-DOPA	3,4-dihidroxi-L-fenilalanina
LHRH	Hormona liberadora de la hormona luteinizante
LTP	Potenciación perdurable, long term potentiation
LY-2087101	2-[(4-fluorofenil)amino]-4-metil-5-tiazolil]-3-tienilmetanona
mAChR	Receptor muscarínico
MR	Mineralocorticoides
MUSK	Quinasas específicas musculares: <i>muscle specific kinase</i>
NA	Noradrenalina
Na _v	Canales de Na ⁺ dependientes de voltaje
Neo	Neomicina
nAChR	Receptor nicotínico
Nic	Nicotina
NIP	Núcleo interpeduncular
NPS	Neuronas preganglionares
NPV	Núcleo paraventricular
NTS	Núcleo del tracto solitario
dNTP	Desoxinucleótido trifosfato
Oxo-M	Oxotremorina-M
pb	Pares de bases
PACAP	Péptido activador de la adenilato ciclasa pituitaria
PBS	Tampón fosfato
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PKA	Proteína cinasa A
PKG	Proteína cinasa G
PNMT	Feniletanolamina-N-metiltransferasa

POMC	Pro-opiomelanocortina
RIC-3	Factor de Resistencia a inhibidores de la colinesterasa; <i>resistance to inhibitors of cholinesterase</i>
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa
SD	<i>Sprague Dawley</i>
SGA	Síndrome general de adaptación
SIF	Fluorescencia pequeña intensiva; <i>small intensely fluorescent</i>
SK	Canal de K^+ dependiente de Ca^{2+} de pequeña conductancia iónica. <i>slow-K^+</i>
SN	Sustancia negra
SNC	Sistema nervioso central
SP	Sustancia P
StAR	Regulador de la esteroidogénesis; steroidogenic acute regulator
TAK1	<i>TWIK-related acid-sensitive K^+</i>
TEA	Tetraetilamonio
TH	Tirosina hidroxilasa
TSH	Niveles plasmáticos de tirotropina
TTX	Tetrodotoxina
V_{50}	Potencial de inactivación 50
V_{comm}	Potencial de compensación
V_h	Potencial de fijación
VIP	Péptido intestinal vasoactivo
V_r	Potencial de membrana en “reposo”
WT	<i>Wild type</i>
α -ArIB	α -conotoxina ArIB
α -AuIB	α -conotoxina AuIB
α -GIC	α -conotoxina GIC
α -ImI	α -conotoxina ImI
α -MII	α -conotoxina MII
α -RgIA	α -conotoxina RgIA
τ	Constante de tiempo
τ_{rec}	Constante de tiempo de recuperación desde el estado de inactivación
$[Ca^{2+}]_i$	Concentración citosólica de Ca^{2+}
5-HT	5 hidroxitriptamina (serotonina)

RESUMEN

Las células cromafines de la médula adrenal son bien conocidas por su participación en la clásica respuesta de *lucha o huida* frente a los estímulos estresantes mediante la liberación de catecolaminas al torrente sanguíneo. La activación de los receptores nicotínicos (nAChRs) de la membrana de las células cromafines constituye el primer eslabón de la cadena de procesos que bajo la denominación de acoplamiento excitación-secreción traduce la liberación de acetilcolina por las terminaciones del nervio esplácnico en la exocitosis de las catecolaminas. Los nAChRs son canales iónicos activados por ligando con estructura pentamérica, formados por muy diferentes combinaciones de 10 subunidades α ($\alpha 1$ - $\alpha 10$) 4 β ($\beta 1$ - $\beta 4$) y las subunidades γ y ϵ . Si bien se ha considerado que el nAChR predominante en las células cromafines de la rata es el de tipo *ganglionar*, formado por las subunidades $\alpha 3$ y $\beta 4$ o $\beta 2$ (Yokotani y col., 2002; Di Angelantonio y col., 2003; Pérez-Álvarez y col., 2012), los resultados de diversos grupos de investigación indican que no sería responsable de más del 50% de la corriente nicotínica de estas células. Por ello, el descubrimiento de un nuevo tipo de nAChR formado por las subunidades $\alpha 9$ y $\alpha 10$ en las células del epitelio sensitivo del sistema auditivo motivó su búsqueda y hallazgo en las células cromafines de la rata (Solís-Garrido, 2006; Colomer y col., 2010). El hecho de que el nAChR $\alpha 9^*$ de las células cromafines incremente su expresión en un modelo de estrés crónico por frío y sus peculiares características biofísicas –elevada permeabilidad al Ca^{2+} – y farmacológicas –sensibilidad a agonistas muscarínicos como la oxotremorina-M y antagonismo por nicotina – posibilitan que ejerza una función inhibidora de la actividad eléctrica celular, única entre los nAChRs, al tiempo que constituya una diana con elevado potencial para una intervención farmacológica selectiva en distintas patologías asociadas al estrés. Ambas circunstancias, incompleta caracterización de los nAChRs de las células cromafines y la plasticidad de los mismos durante el estrés, motivaron la realización de este trabajo, cuyo objetivo fundamental ha sido la caracterización farmacológica de los nAChRs de las células cromafines de la médula adrenal de la rata y el estudio de sus modificaciones en un modelo experimental de estrés crónico por frío (5 días a 4 °C).

Ello ha requerido, con carácter previo, la validación de la selectividad farmacológica de la α -conotoxina RgIA, una toxina capaz bloquear las corrientes iónicas a través de los nAChRs $\alpha 9^*$ y $\alpha 10^*$, en distintos modelos experimentales (células cromafines de rata, células cromafines de ratón *knockout* para la subunidad $\alpha 9$ y sus controles y neuronas de los ganglios de las raíces dorsales de la médula espinal) seleccionados por expresar una, ambas o ninguna de las dos subunidades. Mediante el empleo de la técnica de *patch-clamp* para el registro de corrientes iónicas en células aisladas y cortes de tejido hemos confirmado la selectividad de dicha toxina para interactuar con nAChRs formado por cualquiera de las dos subunidades, así como su carencia de efectos sobre las principales conductancias iónicas (de Na^+ , K^+ y Ca^{2+}) dependientes de voltaje de las células cromafines.

Así mismo, el análisis de los efectos de una amplia batería de fármacos antagonistas nicotínicos (metilicaconitina, α -conotoxina AuIB, α -conotoxina MII, α -conotoxina RgIA, α -conotoxina ArIB-[V11L, V16D]) sobre las corrientes inducidas por diversos agonistas con perfiles farmacológicos diferenciados (acetilcolina, nicotina, oxotremorina-M, RJR 2403, PNU282987) nos ha permitido llevar a cabo la caracterización farmacológica más completa hasta la fecha de los nAChRs de las células cromafines de una especie animal. Así, las células cromafines de la rata expresan predominantemente nAChRs de los tipos $\alpha 3(\alpha 5)\beta 4^*$, $\alpha 3(\alpha 5)\beta 2^*$, $\alpha 7\alpha 9/\alpha 10$ y $\alpha 9 \alpha 10$; con carácter minoritario, expresarían nAChRs $\alpha 7$ homoméricos. Es de destacar, además, que la realización de experimentos de oclusión de los efectos de toxinas específicas para determinadas subunidades formadoras de los nAChRs como la $\alpha 9/\alpha 10$ (α -conotoxina RgIA) y la $\alpha 7$ (α -conotoxina ArIB-[V11L, V16D]) nos ha permitido proponer la existencia de nuevos nAChRs heteroméricos formados por combinaciones de dichas subunidades y que estarían presentes tanto en las células cromafines de la rata y del ratón como en las neuronas de los ganglios de las raíces dorsales de la médula espinal.

Hemos constatado también que la expresión de nAChRs $\alpha 7$ homoméricos, $\alpha 9\alpha 10$ y $\alpha 7\alpha 9/\alpha 10$ se incrementa en las células cromafines de ratas estresadas crónicamente por frío. Se trata de nAChRs con una elevada permeabilidad al Ca^{2+} , lo que, al igual que ocurre con los nAChRs $\alpha 9\alpha 10$ de las células ciliadas cóclea, posibilitaría el acoplamiento funcional con canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} del tipo SK con la consiguiente modificación del potencial de membrana en sentido hiperpolarizante. Este sería el caso también de los nAChRs $\alpha 9^*$ y/o $\alpha 10^*$ de las células cromafines, cuya activación permite acortar la duración de los potenciales sinápticos excitadores (EPSPs) inducidos por la estimulación eléctrica de campo en cortes de la glándula adrenal de la rata, previniendo el bloqueo por despolarización de la transmisión sináptica en la unión esplanco-cromafín. En definitiva, la capacidad de los nAChRs $\alpha 9^*$ y/o $\alpha 10^*$ para facilitar la transmisión en la unión esplanco-cromafín y el aumento de su expresión en condiciones de estrés crónico posibilitarían el incremento de la respuesta secretora de catecolaminas por las células cromafines para satisfacer las demandas del organismo tanto de forma aguda como crónica.

Nota: El asterisco (*) denota la posible presencia de otras subunidades en el nAChR

Palabras clave: célula cromafín; médula adrenal; estrés crónico, receptor nicotínico, canal SK

SUMMARY

Chromaffin cells from the adrenal medulla are well known for their contribution to the classical “fly or fight” stress response through the release of catecholamines into blood circulation. Nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) at the chromaffin cell plasma membrane are the first molecular step in the so-called “excitation-secretion coupling” process, which translates the release of acetylcholine from splanchnic nerve terminals into the exocytosis of catecholamines. Neuronal nAChRs are ligand-gated ion channels with pentameric structure formed by multiple combinations of different α ($\alpha 2$ - $\alpha 10$) and β ($\beta 3$ - $\beta 4$) subunits. The “ganglionic” type ($\alpha 3\beta 4^*$ or $\alpha 3\beta 2^*$) of nAChR has long been considered the predominant nAChR expressed by chromaffin cells. Notwithstanding, results from several researchers concur in that it is responsible for not more than 50% of the cell’s nicotinic current (Yokotani y col., 2002; Di Angelantonio y col., 2003; Pérez-Alvarez y col., 2102). In this context, the finding of a new type of nAChRs formed $\alpha 9$ and/or $\alpha 10$ subunits in the hair cells of the cochlea, prompted the search and ultimately led to their identification in chromaffin cells from the rat adrenal gland (Solís, 2006; Colomer y col., 2010). Moreover, the observation that nAChRs $\alpha 9^*$ expression augments in chromaffin cells from animals exposed to a chronic stress together with their biophysical –high Ca^{2+} permeability– and pharmacological properties –activation by muscarinic agonists, like oxotremorine-M, and block by nicotine– confer this signaling molecule unique capabilities among nAChRs to inhibit cell’s electrical activity and points to it as a potential drug target allowing a selective pharmacological intervention in a variety of stress-related disorders. Both circumstances, incomplete characterization of nAChRs from chromaffin cells and stress-induced plasticity of nAChRs drove the present PhD thesis work. The main objective has therefore been the pharmacological characterisation of nAChRs in rat chromaffin cells and the study of their modification in an experimental model of chronic systemic cold (4° C over 5 days).

This implied, as a prior requirement, to investigate the pharmacological properties of α -conotoxin RgIA, a toxin derived from the marine snail *Conus regius* with purported selectivity to antagonise responses mediated by $\alpha 9^*$ and $\alpha 10^*$ nAChRs. We have made use of the patch clamp technique and rat chromaffin cells, mouse chromaffin cells from wild-type and $\alpha 9$ nAChRs knockout animals, and rat dorsal root ganglion neurons, which express either one of each, both or none of those subunits, to confirm that α -conotoxin RgIA reduces nicotinic currents through $\alpha 9^*$ and/or $\alpha 10^*$ nAChRs while leaving unaffected the rest of nAChRs as well as major ionic conductances (Na_v , K_v , BK, SK, and Cav channels) involved in the control of the electrical activity of excitable cells.

The analysis of the effects of an array of nicotinic antagonists (metillicaconitine, α -conotoxin AuIB, α -conotoxin MII, α -conotoxin RgIA, α -conotoxin ArIB-[V11L, V16D]) on the currents elicited by several agonists with different pharmacological profiles (acetylcholine, nicotine, oxotremorine-M, RJR2403, PNU282987) has allowed us to perform the most detailed pharmacological characterization of nAChRs of chromaffin cells from any animal species, to date. So, rat chromaffin cells predominantly express $\alpha 3(\alpha 5)\beta 4^*$, $\alpha 3(\alpha 5)\beta 2^*$, $\alpha 7\alpha 9/\alpha 10$, and $\alpha 9\alpha 10$

nAChRs; likewise, a minority of homomeric $\alpha 7$ nAChRs $\alpha 7$ are also functionally expressed. It should also be mentioned that occlusion experiments using toxins selective for certain nAChRs subunits, like α -conotoxin RgIA for $\alpha 9$ and $\alpha 10$ subunits, and α -conotoxin ArIB-[V11L, V16D] for the $\alpha 7$ subunit, have made it possible to suggest the existence of novel heteromeric nAChRs formed by the association of those subunits, which would be present at the membrane of both rat and mouse chromaffin cells, and dorsal root ganglion neurons from the rat.

We have also got evidence indicating that the expression of homomeric $\alpha 7$ and heteromeric $\alpha 9\alpha 10$ and $\alpha 7\alpha 9/\alpha 10$ nAChRs is increased in chromaffin cells from cold-stressed animals. All of these nAChRs types are characteristically endowed with high Ca^{2+} permeability, which would favour the functional coupling to Ca^{2+} -dependent K^+ channels of the SK type that mediate the hyperpolarization of the cell membrane. In chromaffin cells in acute tissue slices, electrically-evoked excitatory postsynaptic currents are prolonged by apamin, a selective blocker of SK channels. Interestingly, the effect of apamin on the time course of electrically-evoked excitatory postsynaptic is mimicked by α -conotoxin RgIA treatment, thereby implying a similar mechanism of action. The involvement of $\alpha 9\alpha 10$ nAChRs in the activation SK channels was additionally supported by the ability of a prior treatment with apamin to occlude the effect of α -conotoxin RgIA. Blockade of $\alpha 9^*$ and $\alpha 10^*$ nAChRs also increased the duration of excitatory postsynaptic potentials, which, in turn, would facilitate a depolarization block of synaptic transmission at the splanchnic nerve-chromaffin cells junction. Altogether, these results suggest a role of $\alpha 9^*$ and $\alpha 10^*$ nAChRs in maintaining adrenomedullary catecholamine release under both acute and chronic stress conditions.

Note: The asterisk (*) denotes the possible presence of other nAChRs-forming subunits

Key words: chromaffin cell, adrenal medulla, chronic stress, nicotinic receptor, SK channels

I. INTRODUCCIÓN

1.1. LOS nAChRs: PROTOTIPO DE CANALES IÓNICOS ACTIVADOS POR LIGANDO DE LA FAMILIA *Cys-loop*

Los receptores de la superfamilia con bucle de cisteína (*Cys-loop*) constituyen la clase mayoritaria entre los canales iónicos activados por ligando. Desde un punto de vista funcional se caracterizan por tratarse de receptores directamente acoplados a canales iónicos, de manera que la probabilidad de apertura del canal depende de la concentración de ligando capaz de unirse al mismo y de activarlo (fármaco agonista, según la terminología farmacológica). Están constituidos por subunidades proteicas caracterizadas por presentar una secuencia de 13 aminoácidos flanqueados por dos cisteínas que se unen mediante un puente disulfuro (*Cys-loop*) situado entre los dominios de unión al ligando y el canal iónico. Atendiendo a la selectividad iónica del canal, los receptores *Cys-loop* de los vertebrados pueden ser divididos en canales selectivos para cationes, como nAChRs, el receptor 5-hidroxitriptamina tipo 3 (5-HT₃) de la serotonina o los canales activados por Zn²⁺, y canales selectivos para aniones como los receptores de glicina o de ácido γ -aminobutírico (GABA) de los subtipos A y C (Karlin, 2002).

Los receptores de la familia *Cys-loop* presentan una estructura pentamérica y una apariencia cilíndrica con un poro central delimitado por cinco hélices α aportadas por cada una de las cinco subunidades constituyentes del receptor. Además de este dominio transmembrana central, en los receptores *Cys-loop* es posible identificar un dominio extracelular muy voluminoso, constituido fundamentalmente por láminas β y que porta los lugares de reconocimiento del ligando, y un dominio citoplásmico con funciones reguladoras en el que predominan las hélices α .

Los nAChRs han jugado un papel protagonista no solo en la historia de la farmacología al haberse identificado como la *sustancia receptiva* de la unión neuromuscular (Langley, 1907) sino también en la química y física de las proteínas de membrana al haber sido los primeros receptores en ser aislados, purificados y clonados, y su actividad registrada electrofisiológicamente. Todas estas circunstancias, les han convertido en el modelo por excelencia de los canales iónicos activados por ligando.

La caracterización bioquímica de los nAChRs comenzó en los años 70 del pasado siglo con la solubilización y aislamiento de los receptores presentes en el órgano eléctrico del pez *Torpedo* y de la anguila *Electrophorus*. Gracias al empleo de fármacos como la α -conotoxina BgTx (α -BgTx) o anticuerpos y de técnicas isotópicas fue posible la purificación y reconstitución de los mismos en bicapas lipídicas y la comprobación de sus propiedades funcionales (Unwin, 2003). No fue hasta la década siguiente cuando el advenimiento de las técnicas de biología molecular permitió la clonación, secuenciación y expresión heteróloga de las subunidades constitutivas de los nAChRs (Noda y col., 1982; Noda y col., 1983) al tiempo que el refinamiento de las técnicas de registro electrofisiológico posibilitó el análisis del comportamiento de receptores individuales (Neher y Sakmann, 1976). Más recientemente, el desarrollo de la biología estructural (microscopía electrónica de alta resolución y

difracción de rayos X) (Unwin, 2005) y el hallazgo de las proteínas de unión a la acetilcolina (ACh) (AChBPs) (Brejc y col., 2001) nos ha brindado una imagen molecular detallada de los nAChRs y un elevado nivel de comprensión de los mecanismos de reconocimiento del ligando, apertura y cierre del canal iónico y de la señalización intramolecular que posibilita la modificación de la probabilidad de apertura del canal por ligandos extracelulares (*gating*). El último eslabón en esta cadena de conocimientos incluye el reconocimiento de los nAChRs como asiento de enfermedades (canalopatías) tanto de base autoinmune (miastenia grave) como genética (síndromes miasteniformes, epilepsia nocturna del lóbulo frontal, etc.) (Kalamida y col., 2007).

Los nAChRs son complejos supramoleculares de naturaleza glicoproteica en la que los carbohidratos (galactosa, manosa, glucosa y N-acetilglucosamina) constituyen aproximadamente el 5% de la masa del receptor. Están formados por cinco subunidades con pesos moleculares comprendidos entre 40 y 58 kDa. Las primeras subunidades identificadas fueron las pertenecientes al nAChR de tipo muscular –que incluye al nAChR del órgano eléctrico de los peces– que fueron denominadas α , β , γ y δ (Strader y Raftery, 1980), y a las que se sumó más tarde la subunidad ϵ , que se expresa exclusivamente en el músculo de mamíferos adultos. En la actualidad se reconoce la existencia de 10 subunidades α diferentes ($\alpha 1$ - $\alpha 10$), cuatro subunidades β ($\beta 1$ - $\beta 4$), una subunidad γ , una subunidad δ y una subunidad ϵ .

Los nAChRs pueden clasificarse en tres tipos con propiedades farmacológicas y biofísicas bien diferenciadas y una distribución anatómica característica: el nAChR muscular localizado en la placa motora, el nAChR neuronal periférico, presente en los ganglios vegetativos y en las células cromafines de la médula adrenal, y el nAChR neuronal central, localizado fundamentalmente en diversas zonas del sistema nervioso central (SNC).

Los nAChRs musculares están constituidos por las subunidades $\alpha 1$, $\beta 1$, γ , y δ (en la etapa fetal y en el músculo esquelético denervado) ó ϵ (en la edad adulta) que se asocian con una estequiometría de 2:1:1:1 (**Figura 1.1**). Desde un punto de vista farmacológico se caracterizan por su elevada sensibilidad al agonista succinilcolina y susceptibilidad al bloqueo por α -BgTx y pancuronio, que actúan como antagonistas competitivos.

Los nAChRs neuronales –así llamados aunque también se encuentran en múltiples tejidos no neurales– de los vertebrados están formados por múltiples combinaciones de 9 subunidades α distintas ($\alpha 2$ - $\alpha 10$) y 3 β ($\beta 2$ - $\beta 4$), siendo las subunidades $\alpha 7$, $\alpha 8$ y $\alpha 9$ capaces de formar homómeros funcionales, mientras que el resto de las subunidades α da lugar a receptores heteroméricos constituidos por subunidades α y β .

El análisis de las secuencias de las diferentes subunidades sugiere que todas están compuestas por un extenso dominio N-terminal de localización extracelular que alberga el sitio de unión al ligando, una porción transmembrana constituida por cuatro segmentos con plegamiento α -helicoidal (M1-M4) y un dominio C-terminal, corto y extracelular (Karlin, 2002; Unwin, 2003;

Unwin, 2005) (**Figura 1.2**). Es de destacar que el segmento M2 delimita el poro iónico mientras que el bucle citoplasmático que conecta los segmentos M3 y M4 participa en el ensamblaje de los receptores y posee secuencias consenso para proteínas cinasas y de interacción con proteínas sinápticas.

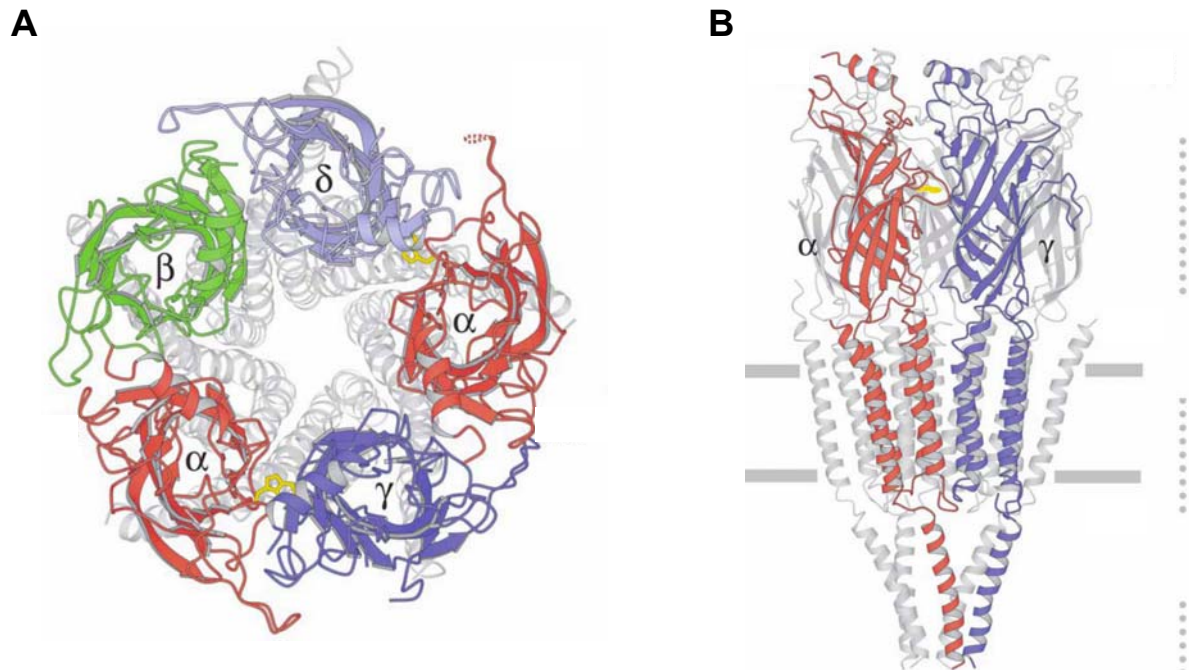
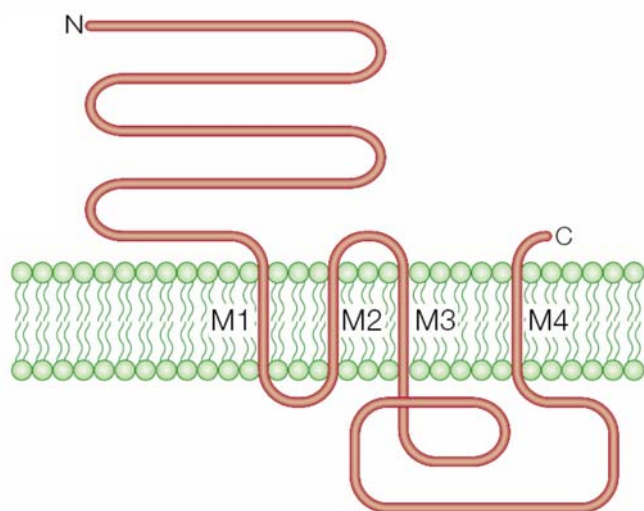


Figura 1.2. Estructura secundaria de una subunidad de los nAChRs. Se puede observar el dominio N-terminal, cuatro segmentos transmembrana, M1-M4, y el pequeño dominio C-terminal. El segmento M2 delimita el poro iónico (Tomada de (Karlín, 2002).



1.1.1. Estructura de los nAChRs

Como ya se ha mencionado, dos avances recientes han contribuido notablemente al conocimiento de la estructura de los nAChRs: el estudio del nAChR del pez *Torpedo* mediante microscopía electrónica de alta resolución y la cristalización de la AChBP. La elevada densidad de nAChRs en el órgano eléctrico del pez *Torpedo marmorata* posibilita la obtención de preparaciones de la proteína cristalizada y la elaboración de imágenes a escala atómica (4 Å) del receptor completo (Miyazawa y col., 1999; Miyazawa y col., 2003; Unwin, 2003; Unwin, 2005).

El procesamiento informático de multitud de imágenes de apariencia similar (los nAChRs individuales) ha llevado a la visualización de los nAChRs como cilindros de 80 Å de diámetro y 125 Å de longitud que atraviesan la totalidad de una membrana plasmática de 65 Å de espesor. Sin embargo, sólo el 25% de la masa del nAChR se encuentra en la membrana, mientras que el 20% de la misma se localiza en citoplasma y el 55% restante se asoma al espacio extracelular formando un gran vestíbulo que se estrecha máximamente a nivel de la membrana, en el denominado filtro de selectividad iónica (**Figura 1.3**).

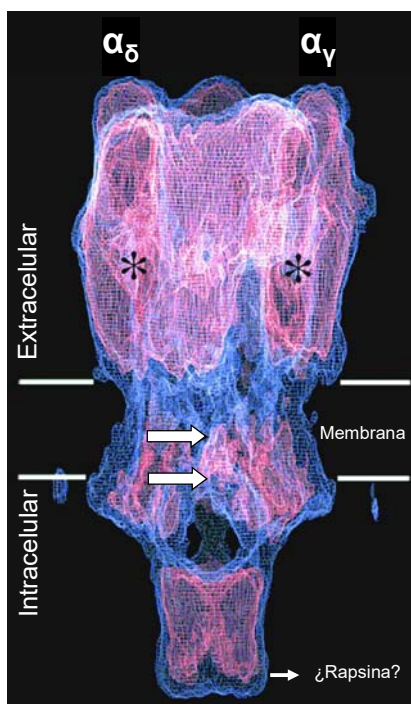


Figura 1.3. Representación bidimensional del nAChR del pez *Torpedo marmorata* obtenida mediante microscopía electrónica de alta resolución. Se observa el dominio extracelular, el canal iónico y la región citoplásmica. Se indica la localización de las subunidades α , los sitios de unión al agonista (*), la compuerta del canal, (flecha superior) presumiblemente cerrada debido a la ausencia de agonista, y el filtro de selectividad del canal (flecha inferior). Las subunidades están ligeramente inclinadas respecto al eje longitudinal del receptor. Al extremo inferior de la región citoplásmica podría estar asociada la proteína rapsina (Tomada de (Brejc y col., 2001).

Por otra parte, la cristalización de las AChBPs del caracol *Lymnaea stagnalis* y de los crustáceos *Aplysia californica* y *Bulinus truncatus* (Smit y col., 2001; Smit y col., 2003; Celie y col., 2005; Hansen y col., 2005) ha aportado valiosa información de la estructura del nAChR a una resolución de 2,7 Å (Brejc y col., 2001). La AChBP de *Lymnaea stagnalis* es una proteína soluble que es secretada por las células gliales del caracol en las sinapsis colinérgicas, donde modula la

neurotransmisión mediante su unión a la ACh. Los cristales de la AChBP presentan forma de barril y dimensiones y estructura similares a las del dominio extracelular de las subunidades α de los nAChRs del pez *Torpedo* (**Figura 1.4**). A esta proteína se unen tanto agonistas como antagonistas competitivos de los nAChRs, incluyendo la ACh, la Nic, la epibatidina, la d-tubocurarina y la α -BgTx (Smit y col., 2001), por lo que se asemeja a un nAChR neuronal homomérico compuesto por las subunidades $\alpha 7$, $\alpha 8$ ó $\alpha 9$.

Los nAChRs homoméricos portan 5 sitios de unión idénticos situados en las interfases entre las caras opuestas de dos subunidades contiguas. Por su parte, los nAChRs heteroméricos poseerían sólo dos sitios de fijación ubicados en las interfases entre subunidades α y β adyacentes, que aportarían, respectivamente, el componente principal y el complementario del sitio de unión. Se considera que los nAChRs heteroméricos funcionales están formados por: i) dos subunidades α auténticas – $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$ o $\alpha 6$ – que aportarían el componente principal del sitio de unión; ii) dos subunidades no- α – $\beta 2$ o $\beta 4$ – que aportarían el componente complementario del sitio de unión, y iii) una quinta subunidad, equivalente a la subunidad $\beta 1$ en el receptor muscular, que no participaría en el sitio de unión del ligando ($\alpha 5$, $\beta 3$, así como $\beta 2$ y $\beta 4$). En la práctica, se han identificado múltiples subtipos de nAChRs que incluyen los formados por una única subunidad α ($\alpha 7$, $\alpha 8$, $\alpha 9$), varias subunidades α solas ($\alpha 7\alpha 8$, $\alpha 9\alpha 10$) o asociadas a alguna subunidad β ($\alpha 2\alpha 5\beta 2$, $\alpha 3\alpha 5\beta 2$, $\alpha 4\alpha 5\beta 2$), una sola subunidad α y varias β ($\alpha 3\beta 2\beta 4$, $\alpha 3\beta 3\beta 4$), múltiples subunidades α y β ($\alpha 3\alpha 5\beta 2\beta 4$) o combinaciones de una subunidad α ($\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$ o $\alpha 6$) con una β ($\beta 2$ o $\beta 4$). Se desconocen los factores que determinan la asociación preferencial de unas subunidades con otras (no todas las combinaciones son posibles o igualmente probables) aunque se piensa que influye la concentración relativa de las mismas, la afinidad química entre ellas y la existencia de algunas moléculas que actúan como chaperonas. Todos estos factores condicionarían los procesos de ensamblaje, tráfico y degradación de los nAChRs.

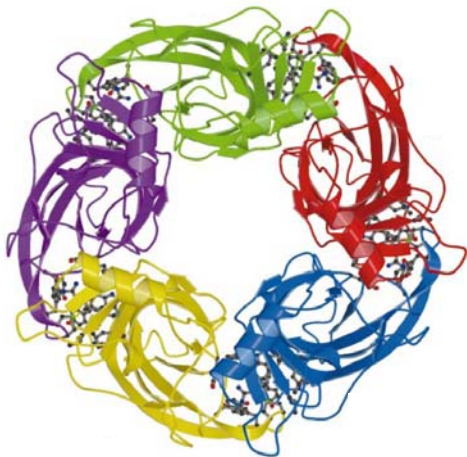


Figura 1.4. Estructura de la AChBP de *Lymnaea stagnalis* determinada mediante difracción de rayos X. La AChBP posee una secuencia de aminoácidos similar a la del dominio N-terminal de los nAChRs del *Torpedo*. Vista desde el espacio sináptico, la AChBP muestra un poro central de 18 Å de diámetro. Los sitios de unión al ligando, representados en la figura mediante diagramas de barras y bolas, se encuentran en el plano ecuatorial de la zona de contacto (interfase) entre las subunidades (Tomada de (Brejc y col., 2001).

Otra contribución relevante al conocimiento de los mecanismos de permeación iónica y transducción de la señal de los nAChRs ha sido la identificación de proteínas homólogas constituyentes de canales iónicos en especies bacterianas como *Gloeobacter violaceus* y *Erwinia chrysanthemi* (Tasneem y col., 2005; Hilf y Dutzler, 2008). Estas proteínas, clonadas y expresadas en células de riñón embrionario humano 293 (HEK 293) y en ovocitos de *Xenopus*, forman canales catiónicos activados por protones extracelulares y presentan una cinética de activación lenta, ausencia de desensibilización y una conductancia unitaria de 8 pS. Así mismo, mediante microscopía electrónica de alta resolución ($\approx 3 \text{ \AA}$) se ha visualizado su estructura homopentamérica con ausencia del dominio N-terminal, del dominio citoplásmico y del puente disulfuro característico de los receptores *Cys-loop*; sin embargo, la proteína contiene la estructura necesaria para la formación de un canal iónico capaz de generar señales eléctricas, presentando una gran abertura exterior flanqueada por residuos hidrofóbicos, en tanto que en la cara interna, formada por anillos de aminoácidos hidrofílicos, se observa una región de pequeño diámetro interno (5 \AA) que probablemente determine la selectividad iónica. El movimiento fundamental para la transducción de la señal consistiría en el deslizamiento de las interfases entre las subunidades y la reorganización de los dominios transmembrana formados por las hélices α de los segmentos M1 y M3 (Bocquet y col., 2007; Bocquet y col., 2009).

1.1.1.1. El dominio extracelular

Nuestro conocimiento actual del dominio extracelular de los nAChRs, y por extensión de los receptores *Cys-loop*, deriva en buena medida del análisis estructural realizado en la AChBP de *L. stagnalis*. La AChBP contiene 210 aminoácidos que presentan una homología del 20-24% con la región N-terminal de los nAChRs y del 15-18% con la de los receptores 5-HT₃, GABA_A, GABA_C y de glicina. El bucle de cisteínas que da nombre a esta familia de receptores también está presente en la AChBP de *L. stagnalis*, si bien comprende 12 residuos (entre las posiciones 123 y 136) en vez de los 13 de los receptores *Cys-loop* auténticos.

Brejci y col., (2001) han identificado los residuos de las zonas de contacto entre las subunidades de la AChBP, que abarcan un área de 2.700 \AA^2 (**Figura 1.4**). A este nivel los aminoácidos son principalmente de carácter neutro, estando pobremente conservados entre los diferentes receptores de la familia *Cys-loop* y entre las distintas subunidades de un mismo receptor. Es de destacar que estas regiones son importantes no sólo para el ensamblaje del receptor sino también para la unión del ligando, lo que refleja la especificidad de los diversos heteropentámeros y explica, en parte, sus diferencias farmacológicas.

El dominio extracelular de los nAChRs porta los sitios de unión de los agonistas y de los antagonistas competitivos. La traducción en sistemas de expresión heteróloga del ácido ribonucleico

mensajero (ARNm) que codifica la subunidad $\alpha 1$ del nAChR muscular supone la inserción de dicha subunidad en la membrana celular pero no comporta el aumento de la fijación de α -BgTx. Sin embargo, la coexpresión de las subunidades $\alpha 1$ y γ ó $\alpha 1$ y δ , pero no de $\alpha 1$ y $\beta 1$, sí comporta la generación de sitios de unión a dicha toxina. Estos resultados indican que el sitio de unión está en la interfase entre las subunidades $\alpha 1$ y γ y $\alpha 1$ y δ , al que las subunidades α aportarían el componente principal (bucles peptídicos A, B y C) mientras que las otras subunidades (γ y δ) aportarían el componente complementario (bucles peptídicos D, E y F) (Blount y Merlie, 1989; Karlin, 2002). Por ello, el nAChR muscular posee dos sitios de unión no idénticos para los fármacos agonistas, localizados en lados opuestos del poro, mientras que en los receptores homoméricos $\alpha 7$, $\alpha 8$ y $\alpha 9$ podrían formarse hasta cinco sitios de unión idénticos entre sí ((Palma y col., 1996). Por otra parte, en los nAChRs heteroméricos neuronales existirían al menos dos sitios de unión localizados en las interfases entre las subunidades α y β .

La porción extracelular de cada subunidad $\alpha 1$ del nAChR está formada por una decena de láminas β ($\beta 1$ - $\beta 10$) y contiene una hélice α en el extremo N-terminal. En esta porción es posible distinguir diversos segmentos peptídicos (bucles A, B y C, el *Cys-loop* y los formados por las láminas $\beta 1$ y $\beta 2$) importantes para la función –unión a ligandos competitivos y acoplamiento entre la unión del agonista y la apertura del canal iónico– del receptor (Unwin, 2005); (**Figura 1.5**).

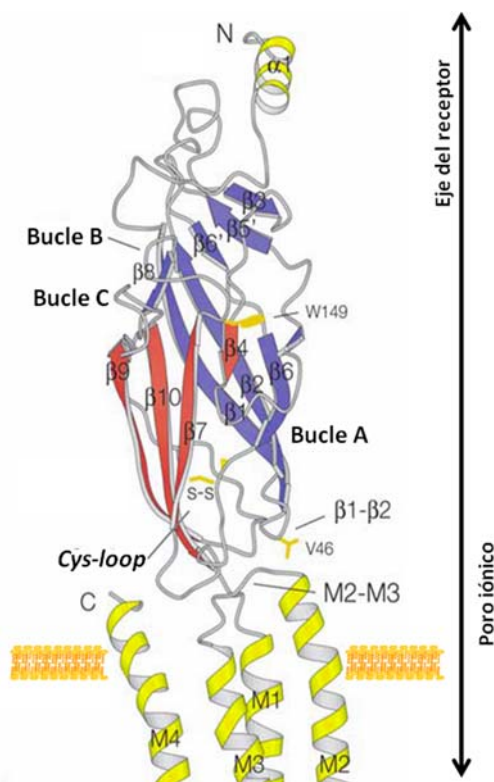
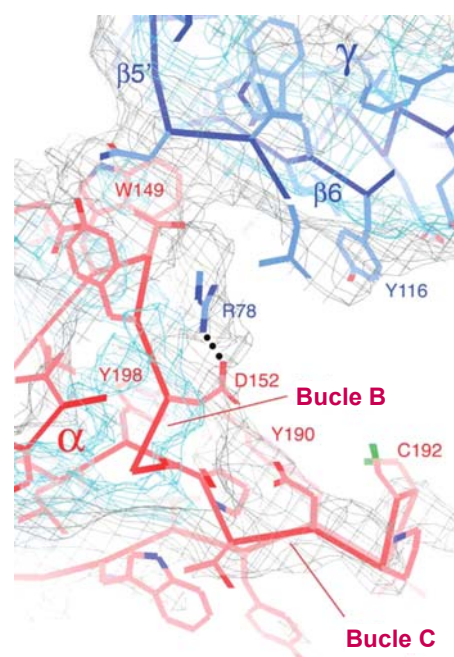


Figura 1.5. Estructura del dominio extracelular de la subunidad $\alpha 1$ de los nAChRs. Vista lateral del plano de la membrana en la que el eje del pentámero se situaría a la derecha (perpendicular a la membrana). Las hélices α se representan en amarillo y las láminas β en azul (las internas) o en rojo (las externas). Se indica la ubicación de los extremos N y C y del *Cys-loop*. En la zona inferior se muestra una parte de los segmentos transmembrana (M1-M4). La barra horizontal representa la membrana celular (Tomado de (Unwin, 2005).

Los principales aminoácidos del sitio de unión aportados por la subunidad $\alpha 1$ son un par de cisteínas contiguas, Cys192/BP187 y Cys193/BP188 (los números corresponden a la subunidad $\alpha 1$ del *Torpedo*, seguidos por los correspondientes en la AChBP precedidos por BP), unidas por un puente disulfuro, y cuatro residuos aromáticos, Tyr93/BP89 (bucle A), Trp149/BP143 (bucle B), Tyr190/BP185 (bucle C) y Tyr198/BP192 (bucle C), que están conservados en todas las subunidades α excepto en la subunidad $\alpha 5$, en la que Asp190 reemplaza a Tyr190 (Galzi y col., 1990; Celie y col., 2004; Unwin, 2005). Toda esta región de la subunidad $\alpha 1$ y las láminas adyacentes $\beta 5$ y $\beta 6$ (Tyr116 o Thr119/BPLeu112, del bucle E) de las subunidades γ o δ , formarían parte del sitio de unión de la ACh en el nAChR muscular (Unwin, 2005) (**Figura 1.6**).

Figura 1.6. Sitio de unión a los fármacos agonistas del nAChR muscular del pez *Torpedo*. Se muestra la interfase entre las subunidades α y γ , los bucles B y C de la subunidad α y las láminas adyacentes $\beta 5$ y $\beta 6$ de la subunidad γ . La subunidad α aparece mayoritariamente en rojo, mientras que la γ lo hace en azul. Algunos residuos clave para la unión de la ACh están identificados. Las cadenas laterales Y190, Y198, C192 del bucle C y W149 del bucle B están conservadas en todas las subunidades α de los nAChRs. Un puente salino entre α D152 y γ R78 podría estar involucrado en la estabilización del bucle B. Algunos contornos poco definidos del bucle C están en gris y cian (Tomada de (Unwin, 2005).



Los agonistas y antagonistas competitivos de los nAChRs suelen poseer al menos un amonio cuaternario o un grupo amonio terciario protonado. El más simple de los agonistas nicotínicos, el tetrametilamonio, contiene sólo un amonio cuaternario. Al parecer, el grupo amonio interaccionaría con las cadenas laterales aromáticas de Tyr93, Trp149, Tyr190 y Tyr198 en la subunidad α , y de Trp53 (bucle D) en la subunidad γ de los nAChRs, y con las cadenas laterales de Tyr89, Trp143, Tyr185, Tyr192 y de Trp53 en la AChBP (**Figura 1.7**). Además, γ Asp174 y δ Asp180 (correspondientes a Asp161 en la AChBP) también intervendrían en dicha interacción, ya que cuando γ Asp174 o δ Asp180 son reemplazados por aminoácidos neutros o dotados de carga positiva disminuye de 100-200 veces la afinidad aparente de los agonistas y de 10-15 veces la de los antagonistas competitivos (Karlin, 2002).

Las subunidades β carecen de las cisteínas en las posiciones 192 y 193 de la subunidad $\alpha 1$ del pez *Torpedo*. No obstante, las subunidades $\beta 2$ y $\beta 4$ poseen el Trp53, característico del bucle D, lo que determina que actúen de forma equivalente a las subunidades γ y δ aportando el componente

complementario del sitio de unión de los ligandos competitivos en los nAChRs neuronales. Las subunidades $\beta 1$, $\beta 3$ y $\alpha 5$ no contribuyen a formar el sitio de unión de los agonistas, por lo que desempeñarían exclusivamente un papel estructural y/o modulador de la función de los nAChRs (Gerzanich y col., 1998; Yu y Role, 1998; Corringer y col., 2000).

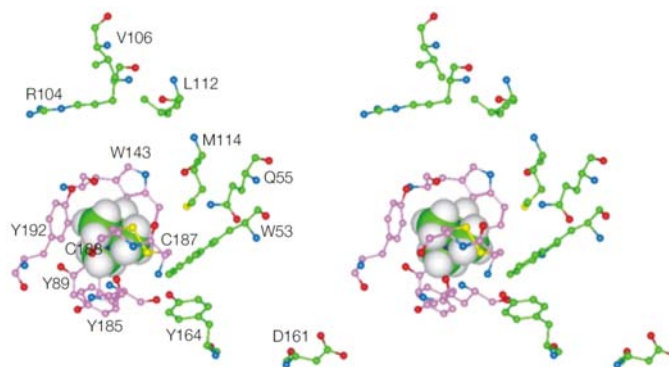


Figura 1.7. Interacción de ligandos competitivos de los nAChRs con la AChBP. Se muestran mediante diagramas de barras y bolas los anillos aromáticos de los aminoácidos implicados en la unión del grupo amonio de los agonistas y antagonistas competitivos de los nAChRs (panel izquierdo) y el cambio estructural inducido en el receptor por la unión del fármaco (panel derecho). El fármaco representado es el tetrametilamonio. Los átomos de carbono de los residuos del componente principal del sitio de unión aparecen en color morado y los del componente complementario en color verde. Los átomos de nitrógeno se representan en azul, los de oxígeno en rojo y los de azufre en amarillo (Tomada de (Karlin, 2002).

Actualmente se piensa que los nAChRs “abrazan” a los fármacos agonistas cuando éstos interactúan con el sitio de unión, de forma similar a lo que ocurre con el receptor de ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propiónico (AMPA) o los receptores de glutamato tipo 2 (GluR2) (Figura 1.7). Un indicio del cambio estructural inducido en el nAChR por la unión del agonista es la menor susceptibilidad del puente disulfuro entre Cys192 y Cys193 de la subunidad $\alpha 1$ del *Torpedo* a la reducción por ditiotreitól. Este cambio conformacional está relacionado con la eficacia de los agonistas ya que es menor o inexistente –apenas varía la susceptibilidad al ditiotreitól– con los antagonistas competitivos, que generalmente presentan un mayor tamaño que los agonistas (Karlin, 2002).

Los dos sitios de unión del nAChR muscular presentan propiedades diferentes. Así, el sitio de unión formado por las subunidades $\alpha 1$ y γ posee una mayor afinidad por los antagonistas competitivos, mientras que el formado por las subunidades $\alpha 1$ y δ manifiesta una mayor afinidad por los agonistas (Blount y Merlie, 1989; Prince y Sine, 1999). Las diferencias entre los dos sitios de unión determinan que la d-tubocurarina se una preferentemente al sitio formado por las subunidades $\alpha 1$ y γ , mientras que la α -conotoxina MI lo haga al constituido por las subunidades $\alpha 1$ y δ (Chiara y col., 1999; Corringer y col., 2000).

Las α -neurotoxinas son antagonistas competitivos de los nAChRs. La elevada afinidad (K_D) (rango nM) y el carácter irreversible de la unión de muchas de estas neurotoxinas las han convertido en herramientas excelentes para el marcaje, cuantificación y extracción de los nAChRs de muy diferentes preparaciones. El ejemplo más relevante lo tenemos en la α -BgTx, obtenida originalmente de la serpiente *Bungarus multicinctus*, que ha resultado indispensable para la caracterización de los nAChRs musculares y neuronales (constituidos por las subunidades $\alpha 7$, $\alpha 8$, $\alpha 9$ y $\alpha 10$).

En los nAChRs se han descrito otros sitios de unión para sustancias diversas que ejercen un efecto modulador de la actividad del canal iónico asociado actuando también sobre el dominio extracelular. Entre estos moduladores alostéricos se encuentran los iones Ca^{2+} (Vernino y col., 1992) y Zn^{2+} (Tonini y col., 2004), la ivermectina (Krause y col., 1998), la albúmina (Conroy y col., 2003), el PNU-120596 (Hurst y col., 2005), algunos esteroides (Curtis y col., 2002), el trifosfato de adenosina (ATP) (Igusa, 1988), las poliaminas (Bixel y col., 2001) y el péptido β -amiloide (Wang y col., 2000).

El dominio extracelular forma el vestíbulo exterior del receptor al que asoman las cadenas laterales eléctricamente cargadas de algunos aminoácidos. El predominio de cargas negativas en esta región no sólo influye en la selectividad iónica del canal sino que también incrementa la concentración relativa de cationes en el vestíbulo, lo que favorece la velocidad de transporte (conductancia) de iones por el canal (Miyazawa y col., 1999; Unwin, 2005) (**Figura 1.8**).

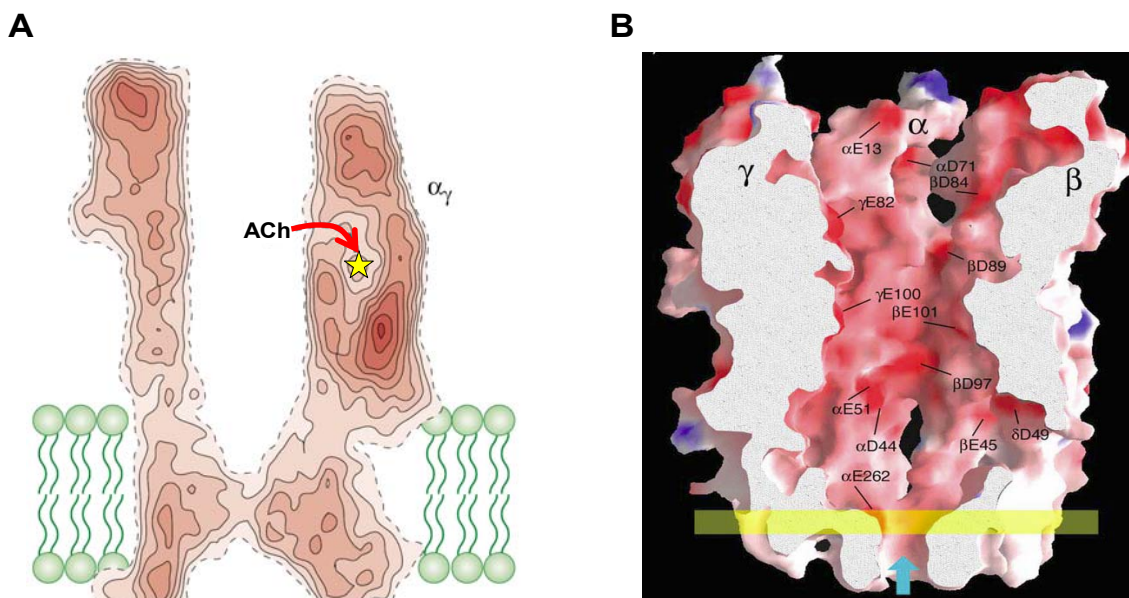


Figura 1.8. Sección longitudinal del dominio extracelular del nAChR del *Torpedo*. **A.** Mapa de densidad electrónica de un nAChR insertado en la membrana plasmática. En amarillo se muestra el sitio de unión de los agonistas y la flecha roja representa la vía de acceso de la ACh. **B.** Superficie interna del vestíbulo exterior del receptor y zonas de contacto entre las subunidades α y β , y α y γ . La barra amarilla representa la membrana celular y la flecha azul el poro iónico. Las superficies electrostáticas negativas y positivas están coloreadas en rojo y azul, respectivamente (Tomada de (Miyazawa y col., 1999; Unwin, 2005).

1.1.1.2. El dominio transmembrana

Las imágenes de microscopía electrónica de los nAChRs del pez *Torpedo* permiten distinguir, en la zona correspondiente a la membrana plasmática, cinco columnas dispuestas alrededor de un eje central en cuyo interior se abriría la luz del canal. Unwin (2005) propuso que la cara interna de esas columnas que delimita el poro iónico estaría formada por la totalidad del segmento M2 y el extremo C del segmento M1 de las distintas subunidades. Por su parte, los segmentos M3 y M4 constituirían la cara externa de esas columnas, estando en contacto directo con los fosfolípidos de la membrana. La estructura secundaria más frecuente en este dominio transmembrana son las hélices α , si bien también se han identificado láminas β y regiones globulares en las zonas más próximas a la superficie extracelular de la membrana (Karlin, 2002); (**Figura 1.9**).

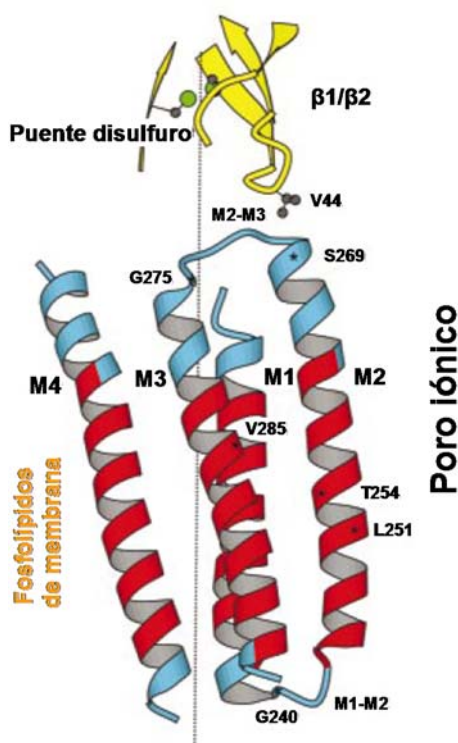
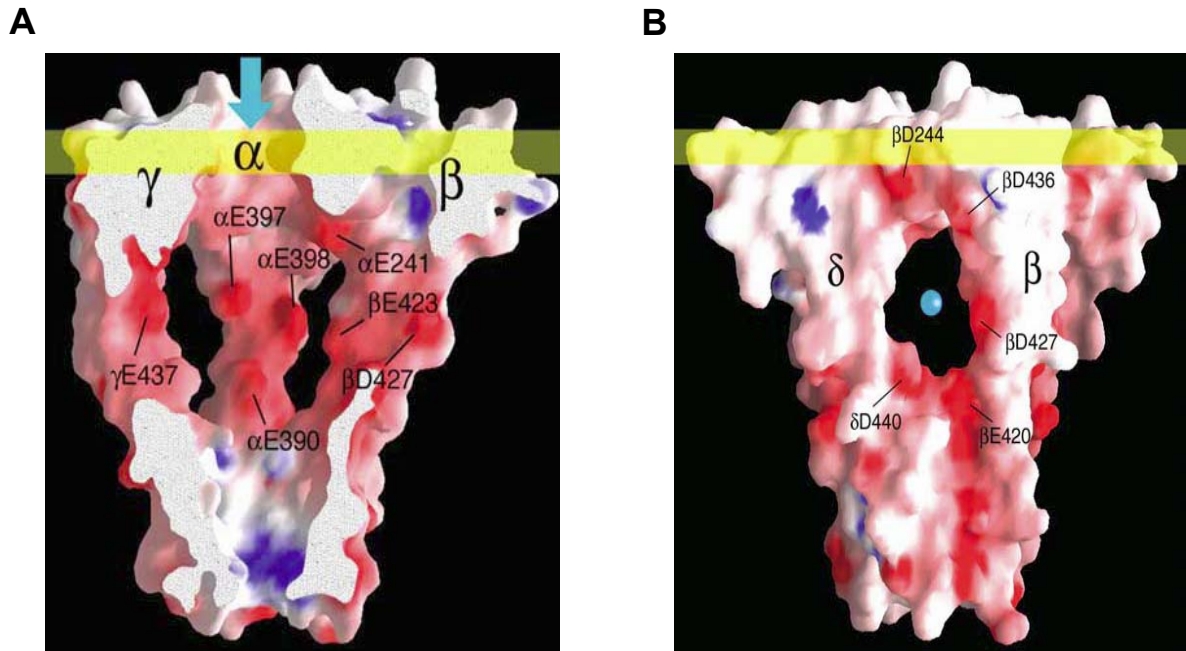


Figura 1.9. Estructura del dominio transmembrana de una subunidad α del nAChR del pez *Torpedo*. La porción situada dentro de la membrana aparece coloreada en rojo. El revestimiento del poro iónico está formado por el segmento M2 y el extremo C-terminal del segmento M1. También se muestran los bucles $\beta 1/\beta 2$ y *Cys-loop*, pertenecientes al dominio extracelular. La línea vertical es perpendicular al plano de la membrana (Tomada de (Miyazawa y col., 2003).

1.1.1.3. El dominio citosólico

La porción intracelular de los nAChRs está formada principalmente por los aminoácidos comprendidos entre los segmentos M3 y M4 e incluye la hélice α curvada MA que precede a M4. Las cinco hélices MA (una por cada subunidad) forman un cono invertido –vestíbulo interno– con cinco aperturas laterales de aproximadamente 8 Å de diámetro (**Figura 1.10A**) que permiten el paso de los iones Na^+ o K^+ rodeados por una primera capa de hidratación (**Figura 1.10B**). El potencial electrostático de la superficie del vestíbulo interno es negativo, lo que determina que los cationes que acceden al mismo bien desde el citoplasma o desde tramos más externos del poro iónico se vean

forzados a pasar a través de esas ventanas laterales al tiempo que se repelen los aniones y se limita el paso de grandes cationes.



1.1.1.4. El poro iónico

Los canales iónicos presentan tres propiedades distintivas entre los transportadores de membrana: i) favorecen la translocación de iones sin coste energético neto, ii) presentan alta selectividad iónica, y iii) se encuentran estrechamente regulados mediante aperturas y cierres que acontecen en la escala de tiempo de los milisegundos.

La forma de embudo doble (diábolo) de la luz del canal de los nAChRs disminuye la barrera energética para la translocación de los iones al permitirles el paso con su capa de hidratación a través de un medio con baja polaridad como es el interior de la proteína del receptor. Sólo una sección muy corta del canal (6 Å de longitud) es lo suficientemente angosta para forzar la deshidratación del ión y su movimiento en fila india. Además, la barrera de energía de esta región puede ser disminuida por las interacciones del ión permeante con las cadenas laterales de los residuos cargados que flanquean el poro. Esta región está situada en el extremo citoplásmico del dominio transmembrana del nAChR

y no sólo contribuye a seleccionar la carga y tamaño del ión permeante sino que también determina la conductancia del canal.

Las primeras evidencias de la importancia del segmento M2 para la función de translocación iónica del nAChR se obtuvieron al estudiar el efecto del intercambio de segmentos entre los nAChRs musculares bovinos y los del *Torpedo*. La asociación de segmentos de las subunidades provenientes de las dos especies daba lugar a nAChRs dotados de sitios de unión para la ACh pero que mostraban diferencias en el transporte iónico (Imoto y col., 1986; Imoto y col., 1988; Imoto y col., 1991; Konno y col., 1991; Bertrand y col., 1993; Unwin, 1993; Unwin, 1995). Las diferencias existentes entre los segmentos M2 de estas dos especies residen en los residuos cargados negativamente, que formarían tres anillos a lo largo del canal. En el nAChR del *Torpedo*, el anillo externo (más próximo al medio extracelular) estaría formado por los aminoácidos α 1E262, β D268, γ Q271 y δ Q276 (**Figura 1.8B**), el anillo intermedio por α 1E241, β E247, γ Q250 y δ E255, y el anillo interno por α 1D238, β D244, γ Q246 y δ E252 (**Figura 1.10**). Es de destacar que en la vecindad del anillo intermedio se sitúan tanto el filtro de selectividad como la compuerta que regula la apertura y cierre del canal. La compuerta de desensibilización sería también una extensión de la compuerta de activación, aunque ambas alternarían su comportamiento en el estado de reposo (compuerta de activación cerrada y compuerta de desensibilización abierta) y en el estado desensibilizado (compuerta de activación abierta y compuerta de desensibilización cerrada) (Auerbach y Akk, 1998).

La apertura del canal se inicia con el movimiento de la compuerta de activación y el consiguiente ensanchamiento del filtro de selectividad que aumenta su diámetro en aproximadamente 5 Å (desde 3 hasta 8 Å). El movimiento fundamental para la apertura del poro parece ser la rotación de las hélices α de los segmentos M2, como se deduce del análisis de los cambios en la estructura del nAChR del *Torpedo* cuando se le expone brevemente a la ACh (Unwin, 1995) y de modelos moleculares del nAChR homomérico α 7 (Taly y col., 2006). Una vez ocupado el receptor por el agonista, la apertura del canal se produce en microsegundos, existiendo aperturas y cierres múltiples durante cada ocupación.

Los nAChRs de los vertebrados forman canales selectivos para cationes monovalentes y divalentes. En los nAChRs musculares se han realizado mediciones de la permeabilidad relativa al Na^+ (P_X/P_{Na}) de más de 50 cationes de pequeño tamaño (**Tabla 1.1**). Los iones permeantes no sólo incluyen a los alcalinos o alcalinotérreos, sino también a diversos cationes orgánicos como el amonio o la guanidina que muestran permeabilidades relativas comprendidas entre 1,3 y 2,0. Por consiguiente, cabe concluir que si bien los nAChRs no son permeables a los aniones, apenas discriminan entre los cationes pequeños (Adams y col., 1980; Dwyer y col., 1980).

La permeabilidad de los iones monovalentes es proporcional a su movilidad en agua y, consiguientemente, aumenta con el radio del ión. Por el contrario, la permeabilidad a los iones

divalentes y la conductancia de los monovalentes disminuye con su radio, lo que indica que los iones permeantes interactúan al menos con un sitio en el poro iónico.

Es de destacar que la conductancia de los nAChRs es mucho más sensible a cambios en la carga del anillo intermedio (Konno y col., 1991) que en la de los anillos externo o interno. A título de ejemplo, baste señalar que la sustitución de un ácido glutámico –dotado de carga negativa– por alanina –aminoácido neutro– en el anillo intermedio del nAChR homomérico $\alpha 7$ suprime la permeabilidad al Ca^{2+} e incrementa la permeabilidad del Cl^- (desde 0,05 a 0,1) sin afectar la permeabilidad del Na^+ (Bertrand y col., 1993).

Tabla 1.1. Permeabilidades iónicas relativas del nAChR de la unión neuromuscular de la rana (Tomadas de Dwyer y col., 1980 y Adams y col., 1980).

Ión o molécula	P_x/P_{Na}
Li^+	0,87
Na^+	1,00
K^+	1,11
Cs^+	1,42
Tl^+	2,51
Ca^{2+}	0,2
NH_4^+	1,79
Guanidina	1,59
Metilamonio	1,34
Etilamonio	1,13
Dimetilamonio	0,87
Trimetilamonio	0,36
Tris ⁺	0,18
Colina	0,13
Trietilamonio	0,09
Arginina	<0,014
Tetrakisetanolamonio	<0,010

1.1.2. Síntesis, ensamblaje y regulación de la expresión de los nAChRs

La transcripción del ácido desoxirribonucleico (ADN) en ARNm generalmente implica la eliminación de los intrones (secuencias no codificantes) y el correcto ensamblaje de todos los exones (secuencias codificantes). Sin embargo, pueden existir ensamblajes (*splicing*; *ayuste*) alternativos que determinan que uno o varios de los exones no se transcriben en el ARNm. Además, parte de la secuencia de algún intrón puede también ser insertada en el ARNm haciendo que la longitud de los exones sea mayor (Smith y Valcarcel, 2000), y consiguientemente, posibilitando la expresión de varias isoformas de una proteína. El ayuste alternativo es muy común en vertebrados y, particularmente, en humanos. Se estima que, como mínimo, el 35% de los genes generan varias

proteínas que son el resultado de este proceso (Croft y col., 2000; Sorek y col., 2004). La estructura de exones e intrones de los genes de los nAChRs denota una predisposición hacia el procesamiento alternativo (Lustig y col., 2001; Lustig y Peng, 2002). Entre las isoformas de las subunidades de los nAChRs, que se han identificado, las más numerosas son las de la subunidad $\alpha 7$ (García-Guzmán y col., 1995; Saragoza y col., 2003; Severance y col., 2004), aunque existen pocos estudios sobre el significado funcional de las mismas.

Las proteínas destinadas a ser *exportadas* por la célula –término que hace referencia no solo a la liberación al medio extracelular sino también a la incorporación a estructuras como la membrana plasmática– son sintetizadas en el retículo endoplásmico rugoso y alojadas en el interior de sus cisternas membranosas. El ADN de estas proteínas codifica también un péptido dotado de una secuencia de aminoácidos hidrofóbicos –péptido señal– que determina su incorporación a la membrana del retículo endoplásmico (Anderson y col., 1983) y posibilita su elongación –a partir del extremo N-terminal– en el espacio intraluminal. La elongación de los péptidos durante la síntesis de proteínas se produce a razón de tres a cinco aminoácidos por segundo a 37 °C, de manera que una subunidad de los nAChRs (aproximadamente 460 residuos) puede sintetizarse en aproximadamente dos minutos (Merlie y Smith, 1986; Wang y col., 1996). La compleja topología transmembrana de las subunidades constitutivas de los canales iónicos está codificada mediante segmentos hidrofóbicos adicionales. Así, los segmentos hidrofóbicos (M1-M4 en los nAChRs) son considerados como regiones de anclaje a la membrana mientras que las secuencias de aminoácidos polares se localizan intraluminalmente.

El proceso de maduración postraducciona l de las subunidades de los nAChRs incluye la escisión del péptido señal y la incorporación de un oligosacárido a un residuo de asparagina localizado en el extremo N-terminal. Cabe señalar que en esta fase del procesamiento, los péptidos no son todavía reconocidos por antagonistas selectivos (α -BgTx) o anticuerpos preparados frente a nAChRs nativos. Sólo después de unirse a la chaperona calnexina se produce la oligomerización de las subunidades y puede evidenciarse la aparición de sitios de unión a compuestos específicos. La formación de los pentámeros constituyentes de los nAChRs musculares se produciría en dos etapas consecutivas, barajándose dos hipótesis respecto a la secuencia de ensamblaje. La primera sostiene que en la etapa inicial se formarían los dímeros $\alpha 1\gamma$ y $\alpha 1\delta$, capaces ya de unirse a ligandos selectivos, en tanto que la segunda hipótesis propone que es la formación del trímero $\alpha 1\beta 1\gamma$ la que precedería a la segunda etapa de ensamblaje del pentámero.

Una vez completado el plegamiento de la proteína y llevada a cabo la glicosilación inicial, los nAChRs pasan al aparato de Golgi donde son adicionalmente glicosilados, clasificados (*sorted*) y almacenados en vesículas que habrán de transportarlos a la membrana plasmática (**Figura 1.11**). Se ha descrito que las subunidades de los nAChRs neuronales presentan una secuencia de aminoácidos (posiciones 201 a la 235) en el segmento M1 que enlentece la translocación a la

superficie celular (Dineley y Patrick, 2000). Por el contrario, las subunidades $\alpha 4$ y $\beta 2$ deben poseer aminoácidos hidrofóbicos en el lazo citoplásmico situado entre los segmentos M3 y M4 (posiciones 351 a la 358) para su expresión eficiente en la membrana celular (Ren y col., 2005).

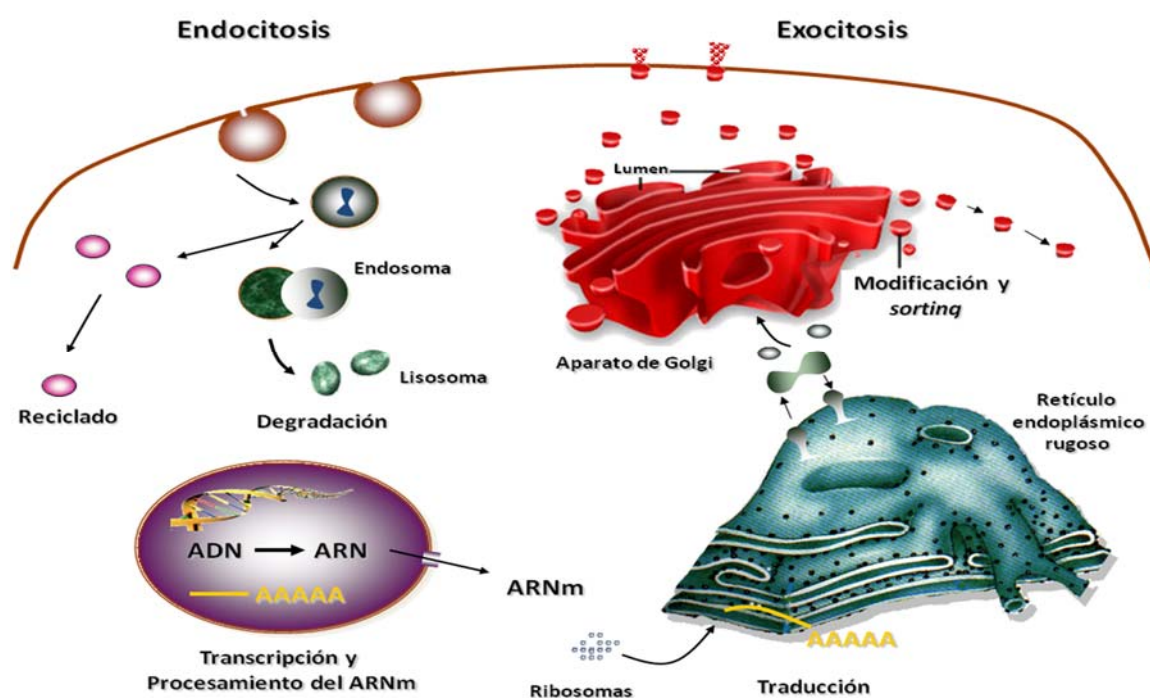


Figura 1.11. Síntesis y tráfico de las proteínas de membrana. Se muestra el diagrama de una célula en el que se representan las distintas fases de la síntesis (transcripción del ADN y traducción del ARNm), maduración (*sorting*, modificación y ensamblaje), reciclado y degradación de las proteínas de membrana.

Estudios recientes con el nemátodo *Caenorhabditis elegans* han identificado en el retículo endoplásmico y aparato de Golgi a la proteína RIC-3 (factor de resistencia a los inhibidores de la colinesterasa; *resistance to inhibitors of cholinesterase*) que, actuando como chaperona, ejercería efectos diversos sobre el tráfico de los nAChRs. Así, la expresión en ovocitos de *Xenopus laevis* de esta proteína o de su homóloga humana, hRIC-3, incrementa el número de nAChRs $\alpha 7$ funcionales en la membrana celular (Castillo y col., 2005; Williams y col., 2005), en tanto que causa una marcada inhibición de la expresión de nAChRs heteroméricos como el $\alpha 3\beta 4$ o el $\alpha 4\beta 2$ (Halevi y col., 2003; Millar, 2008). Sin embargo, en células tsA201 humanas se ha descrito un incremento en la expresión de los nAChRs $\alpha 2\beta 2$, $\alpha 3\beta 4$, $\alpha 4\beta 2$ y $\alpha 4\beta 4$ (Lansdell y col., 2008). La regulación de la expresión de los nAChRs por RIC-3 podría tener similitudes con lo que ocurre tras la exposición crónica a la nicotina (Nic) (Millar y Harkness, 2008), y que en el caso concreto de los nAChRs $\alpha 7$ parece implicar tanto el incremento de su transporte hacia la membrana como la reducción de su internalización (Castelan y col., 2008; Lansdell y col., 2008) sin que se modifique la transcripción de ARNm o la

síntesis de proteínas (Flores y col., 1992; Harkness y Millar, 2002; Avila y col., 2003; Vallejo y col., 2005).

Los nAChRs de la membrana de las células musculares embrionarias (miotubos) presentan una elevada movilidad lateral que se traduce en un coeficiente de difusión de 10^{-10} cm²/s (Peters y col., 1981). Además, esta elevada movilidad se asocia a una distribución uniforme en la superficie de la célula. Sin embargo, conforme avanza el periodo fetal los nAChRs comienzan a formar agregados, generándose zonas de alta sensibilidad a la ACh. En el músculo adulto estas zonas quedan restringidas a la región sobre la que se sitúa el axón de la motoneurona (placa motora). A este nivel los agregados de nAChRs son esencialmente inmóviles, presentando coeficientes de difusión inferiores a 10^{-12} cm²/s. La rapsina es una proteína (43 kDa) citoplásmica esencial para la agregación de los nAChRs postsinápticos (Duclert y Changeux, 1995; Colledge y Froehner, 1998; Sanes y Lichtman, 1999). La inyección en ovocitos de *Xenopus laevis* de ARNm de las subunidades $\alpha 1$, $\beta 1$, γ y δ determina la expresión de los nAChRs con una distribución difusa en la superficie de la célula; sin embargo, su coexpresión con rapsina conlleva la aparición de agregados de nAChRs. Mediante inmunoprecipitación se ha demostrado que la rapsina se encuentra colocalizada con los nAChRs en el músculo de los mamíferos pudiendo visualizarse en las micrografías electrónicas de los nAChRs del *Torpedo* formando parte de la región citoplásmica más profunda (**Figura 1.3**).

La localización y agregación de los nAChRs neuronales y de la placa motora está también regulada por la agrina, un proteoglicano de la lámina basal que reviste la hendidura sináptica delineando los lugares donde se concentran los nAChRs postsinápticos. Los efectos de la agrina están mediados por una compleja vía de señalización en la que cabe distinguir la intervención de tirosina cinasas como la quinasa específica muscular (MuSK) y Src, la elevación de la concentración citosólica de Ca²⁺ ([Ca²⁺]_i) y la fosforilación de los nAChRs (Duclert y Changeux, 1995; Colledge y Froehner, 1998; Sanes y Lichtman, 1999; Martin y col., 2005a).

Al igual que otras proteínas de membrana, los nAChRs están sometidos a recambio mediante internalización y posterior degradación en los lisosomas (Fambrough, 1979; Salpeter y Loring, 1985) y por el sistema ubiquitina-proteosoma. La ubiquitina-1 sería el miembro de la familia de proteínas de la ubiquitina implicada en el reciclaje de los nAChRs (Christianson y Green, 2004; Ficklin y col., 2005). La velocidad de recambio de los nAChRs ha sido medida a través de la liberación de aminoácidos radioactivos previamente incorporados a los nAChRs o la desaparición de nAChRs de la membrana celular marcados con α -BgTx (fluorescente o radioactiva). La pérdida de los receptores marcados sigue una cinética exponencial, como si los receptores nuevos –recientemente incorporados a la membrana– y los viejos tuvieran igual probabilidad de ser degradados. El 4% de los nAChRs de los miotubos de mamíferos y aves es degradado cada hora, lo que corresponde a una semivida de 17-23 h (37 °C). Una vez que los músculos son inervados y las placas motoras completan su maduración, el recambio receptorial se ralentiza presentando una semivida de una a varias

semanas. La denervación acelera nuevamente el recambio receptoral y la expresión de los nAChRs en localizaciones extrasinápticas.

1.1.3. Los nAChRs neuronales

Desde los estudios de Paton y Zaimis (1949) se conoce la existencia de nAChRs farmacológicamente distintos de los presentes en el músculo esquelético. En la década de los 80 del siglo pasado, se identificaron en el cerebro de roedores sitios de unión a radioligandos nicotínicos (α -BgTx y Nic) con marcadas diferencias en sus perfiles farmacológicos y localización (Romano y Goldstein, 1980; Clarke, 1992). Desde el punto de vista biofísico los nAChRs neuronales se distinguen de los nAChRs musculares por presentar una mayor permeabilidad al Ca^{2+} y una marcada rectificación de entrada (Adams y Nutter, 1992; Castro y Albuquerque, 1995).

La clonación de la práctica totalidad de las subunidades que forman los nAChRs neuronales y la expresión heteróloga de las mismas en diversos sistemas celulares, así como el empleo de técnicas de hibridación *in situ* e inmunohistoquímica han posibilitado el conocimiento detallado de la composición, la localización anatómica y el perfil farmacológico y biofísico de esta clase de nAChRs.

Desde la clonación de la subunidad $\alpha 3$ en 1986 (Boulter y col., 1986), se han identificado en los mamíferos otras diez subunidades formadoras de nAChRs neuronales: $\alpha 2$ - $\alpha 7$, $\alpha 9$, $\alpha 10$, $\beta 2$ - $\beta 4$ (Jensen y col., 2005; Gotti y col., 2006). Además, en aves se ha descrito la subunidad $\alpha 8$ (Schoepfer y col., 1990).

Las subunidades α de los nAChRs neuronales se caracterizan, al igual que la subunidad $\alpha 1$ de los nAChRs musculares, por presentar dos cisteínas contiguas –correspondientes a $\alpha 1\text{Cys192/BP187}$ y $\alpha 1\text{Cys193/BP188}$ en el *Torpedo* y la AChBP–, así como los cuatro residuos aromáticos en el sitio de unión al ligando (ver sección 1.1.1). Todas las subunidades α son capaces de aportar el componente principal del sitio de unión a los agonistas excepto la subunidad $\alpha 5$ que carece de una tirosina en el bucle C (homóloga a la $\alpha 1\text{Tyr190}$ del *Torpedo*) (Wang y col., 1996). Aunque ninguna de las subunidades β posee las cisteínas adyacentes en el dominio N-terminal, las subunidades $\beta 2$ y $\beta 4$ presentan un triptófano (Trp53 en el *Torpedo*), característico del bucle D y que les permite desempeñar un papel similar al de las subunidades γ y δ de los nAChRs musculares al constituir el componente complementario del sitio de unión. La ausencia de este residuo en la subunidad $\beta 3$ la asemeja a la subunidad $\beta 1$ de los nAChRs musculares, no participando en la formación del sitio de unión al agonista (Corringer y col., 2000). En consecuencia, la incorporación de las subunidades $\alpha 5$ y $\beta 3$ en los nAChRs neuronales se traduce fundamentalmente en modificaciones de las propiedades biofísicas, como la permeabilidad al Ca^{2+} o la desensibilización, más que del perfil farmacológico de los mismos (Ramírez-Latorre y col., 1996; Gerzanich y col.,

1998; Boorman y col., 2003; Grinevich y col., 2005). En contraste, las subunidades $\alpha 7$, $\alpha 8$ y $\alpha 9$ pueden formar nAChRs homoméricos aportando tanto el componente principal como el componente complementario del sitio de unión a los agonistas (Lindstrom, 1997; Gotti y col., 2006) (**Figura 1.12**).

1.1.3.1. Características farmacológicas de los nAChRs neuronales

Aunque el número de nAChRs neuronales distintos que puede formarse por la combinación de las once subunidades descritas es muy elevado, es posible reconocer tipos mayoritarios con propiedades bien diferenciadas: $\alpha 4\beta 2$, $\alpha 3\beta 4(\beta 2)$, $\alpha 7$ y los $\alpha 9\alpha 10$ (**Figuras 1.12 y 1.13**). El nAChR $\alpha 4\beta 2$ es el tipo predominante en el SNC donde mayoritariamente presenta la estequiometría $(\alpha 4)_2(\beta 2)_3$; esta combinación exhibe una respuesta similar a la Nic y a la citisina, siendo también activado por epibatidina, RJR2403, TC2559 y 5-Iodo-A-85380; además, es sensible al antagonista dihidro- β -eritroidina con una concentración inhibitoria 50 (CI_{50}) de 0,1 μM (Cordero-Erausquin y col., 2000; Papke y col., 2000; Karadsheh y col., 2004; Moroni y col., 2006; Zwart y col., 2006). La sustitución de una subunidad $\beta 2$ por una $\beta 4$ se asocia con una menor afinidad por la mayoría de ligandos, mientras que la incorporación de una subunidad $\alpha 5$ ($\alpha 4\alpha 5\beta 2$) conlleva una mayor permeabilidad al Ca^{2+} y velocidad de desensibilización así como una disminución de la potencia de los agonistas (Ramírez-Latorre y col., 1996; Xiao y Kellar, 2004; Kuryatov y col., 2008). Recientemente se ha utilizado la sazetidina-A como *silent desensitizer* de los nAChRs $\alpha 4\beta 2$, ya que presenta la peculiar propiedad farmacológica de desensibilizar al receptor sin activarlo previamente, probablemente debido a su baja afinidad por el estado de reposo y a su elevada afinidad por los estados desensibilizados del receptor (Xiao y col., 2006; Zwart y col., 2008).

Por su parte, el nAChR compuesto por las subunidades $\alpha 3$ y $\beta 4$ ó $\beta 2$ se localiza preferentemente en los ganglios autónomos y en las células cromafines de la médula adrenal, responde mejor a citisina que a Nic (Cordero-Erausquin y col., 2000) y es bloqueado selectivamente por las α -conotoxina AuIB (α -AuIB; $CI_{50(\alpha 3\beta 4)}$ de 750 nM) (Luo y col., 1998), α -conotoxina MII (α -MII) y α -conotoxina GIC (α -GIC; $CI_{50(\alpha 3\beta 2)}$ de 0,5-8 nM y de 1,1 nM, respectivamente) (Cartier y col., 1996; Kaiser y col., 1998; McIntosh y col., 2002; Di Angelantonio y col., 2003). Por otra parte, cuando la subunidad $\alpha 5$ es incorporada a complejos que contienen las subunidades $\alpha 3$ y $\beta 2$, los nAChRs formados incrementan su sensibilidad a la ACh y a la Nic pero no se modifica el efecto de la epibatidina (Wang y col., 1996).

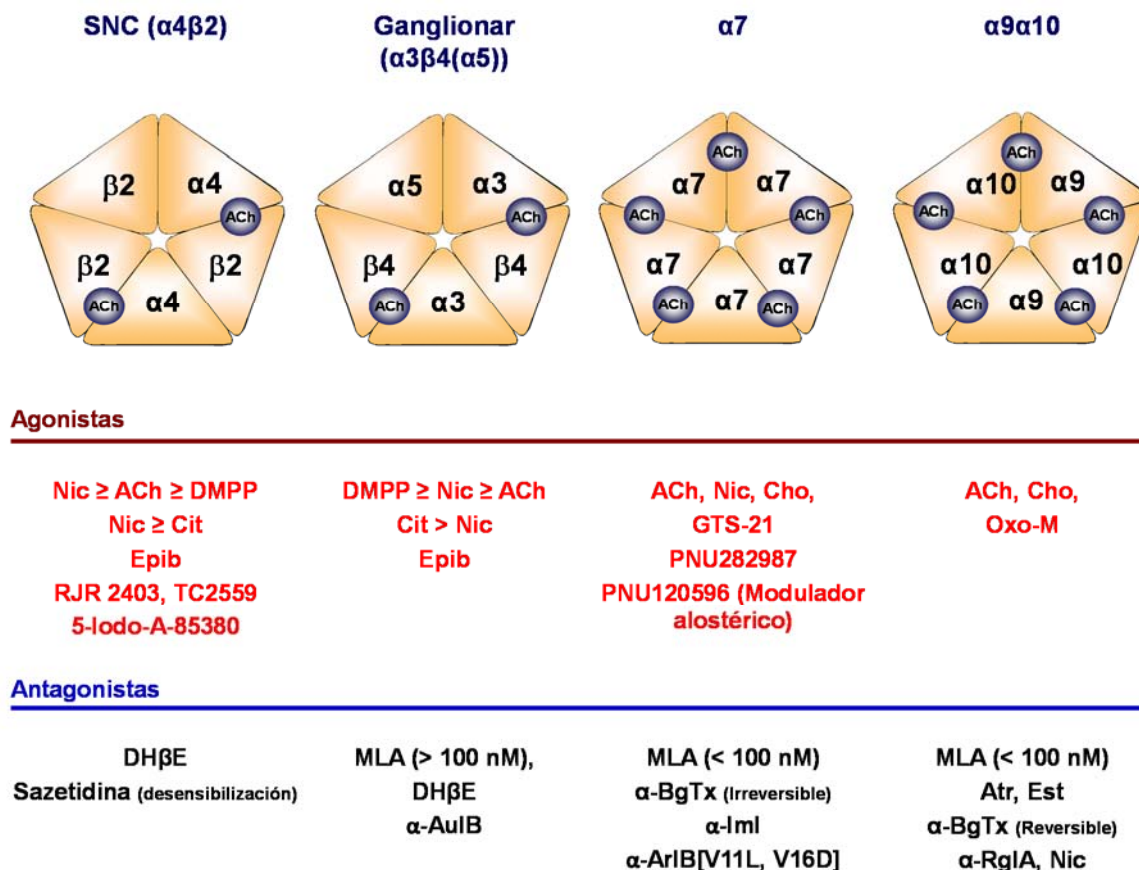


Figura 1.12. Farmacología de los nAChRs neuronales. En el panel superior se representan los cuatro tipos principales de nAChRs neuronales mientras que en el panel inferior se resumen sus propiedades farmacológicas, reseñándose los fármacos agonistas y antagonistas esenciales para realizar una caracterización farmacológica de cada subtipo. dimetilfenilpiperazinio (DMPP): 1,1-dimetil-4-fenil-piperacino; Cit: citisina; Epib: epibatidina; Cho: colina; DHβE: dihidro-β-eritroidina; MLA: metillicaconitina; α-conotoxina Iml: α-Iml; α-conotoxina RglA: α-RglA; Atr: atropina; Est: estircina (Adaptado de (Wonnacott y Barik, 2007)).

La subunidad α6 se expresa tanto en el SNC como en el sistema nervioso periférico (SNP). A nivel central se ha descrito su presencia en el *locus coeruleus*, área tegmental ventral, estriado, sustancia negra y retina (Le Novere y col., 1996; Goldner y col., 1997; Vailati y col., 1999; Han y col., 2000; Quik y col., 2000; Azam y col., 2002). Periféricamente, ha sido identificada en el epitelio olfatorio, ganglio del trigémino y células cromafines de la médula adrenal humana y de mono (Fucile y col., 1998; Keiger y Walker, 2000; Pérez-Álvarez y col., 2012b; Hernandez-Vivanco y col., 2014). La subunidad α6 forma parte de nAChRs heteroméricos de elevada complejidad, constituidos por tres o más subunidades distintas. La composición de estos nAChRs varía en función de la región cerebral e incluso en el seno de la misma. Así, en los somas de las neuronas catecolaminérgicas de la sustancia negra y en el área tegmental ventral la combinación predominante sería la α4α6α5(β2)₂ (Klink y col., 2001), mientras que en el estriado sería la α4α6β2β3 (Champtiaux y col., 2003). En la retina de pollo la subunidad α6 se asociaría preferentemente con las subunidades β4, β3 y α3 (Vailati

y col., 1999) y en las células cromafines humanas y de mono con la $\beta 4$ (Pérez-Álvarez y col., 2012b; Hernandez-Vivanco y col., 2014).

La α -MII[S4A, E11A y L15A] y la α - MII[H9A, L15A] son antagonistas potentes (CI_{50} de 33 y 217 nM) y selectivos de los nAChRs $\alpha 6\beta 2$ (McIntosh y col., 2004; Azam y col., 2008). Por su parte, la α -MII y la α -GIC también actúan con elevada potencia sobre los receptores $\alpha 6\beta 2$ (CI_{50} de \approx 1 nM), pero carecen de selectividad en relación con los nAChRs $\alpha 3\beta 2$ (Cartier y col., 1996; Kaiser y col., 1998). Análogamente, la MLA y la α - ImI no discriminan entre los nAChRs $\alpha 6\beta 2$, $\alpha 7$ y $\alpha 9\alpha 10$ (Johnson y col., 1995; Mogg y col., 2002).

La subunidad $\alpha 7$ presenta una distribución ubicua en el sistema nervioso. Posee la capacidad de formar nAChRs homoméricos que son activados selectivamente por colina (Cho) (Alkondon y col., 1997), GTS-21 (Papke y col., 2000) y PNU-282987 (Hajos y col., 2005). Entre los antagonistas selectivos se cuentan la MLA (a concentraciones inferiores a 100 nM), la α -ImI (CI_{50} de 220 nM) (Johnson y col., 1995), la α -ArIB-[V11L, V16D] (CI_{50} de 1 nM) (Whiteaker y col., 2007) y la α -BgTx (CI_{50} de 1-100 nM; efecto irreversible) (Couturier y col., 1990; Alkondon y Albuquerque, 1993; Paterson y Nordberg, 2000; Elgoyhen y col., 2001; Ellison y col., 2004); además, es modulado alostéricamente por el PNU-120596 (Hurst y col., 2005) (**Figuras 1.12 y 1.13**).

En estructuras como la cóclea, los DRG de la médula espinal, linfocitos, queratinocitos y las células cromafines de la médula adrenal se han identificado nAChRs formados por las subunidades $\alpha 9$ y/o $\alpha 10$. Estos nAChRs presentan un perfil farmacológico peculiar, siendo activados por Oxo-M, un clásico agonista muscarínico, y bloqueados por Nic, MLA y α -BgTx (efecto reversible) (Elgoyhen y col., 1994; Elgoyhen y col., 2001). El aislamiento de la α -RgIA del veneno del caracol *Conus regius* ha permitido disponer de una herramienta potente y selectiva para bloquear las respuestas mediadas por los nAChRs $\alpha 9^*$ y/o $\alpha 10^*$, posibilitando el estudio del papel funcional de este receptor en algunos de los tejidos en los que ha sido identificado (véase la sección 1.2).

1.1.3.2. Significado funcional de los nAChRs neuronales

Tradicionalmente se ha considerado que los nAChRs neuronales se expresan de forma casi exclusiva en el cerebro y en las sinapsis ganglionares periféricas; no obstante, hoy día existen numerosos datos experimentales que avalan también la localización extraneuronal de esta familia de nAChRs (Flora y col., 2000; Kawashima y Fujii, 2000; Kurzen y col., 2004). Por otra parte, el desarrollo de ratones con ablación de los genes (*knockout*; KO) que codifican alguna de las subunidades ($\alpha 3$ - $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\alpha 7$, $\alpha 9$, $\alpha 10$, $\beta 2$ - $\beta 4$) de los nAChRs neuronales ha facilitado la indagación del significado funcional de las mismas (Wang y col., 2002). Cabe señalar que de todas las estudiadas, sólo la subunidad $\alpha 3$ parece ser imprescindible para la supervivencia del animal (Xu y col., 1999).

En la **Tabla 1.2** se muestran las localizaciones principales de las distintas subunidades formadoras de nAChRs neuronales y las funciones más relevantes que les han sido atribuidas.

La innervación colinérgica en el SNC, actuando sobre los nAChRs, regula la liberación de neurotransmisores, la excitabilidad celular o la integración sináptica. Todos estos procesos son fundamentales para la comunicación interneuronal implicada en funciones tan importantes como el sueño, la fatiga, la ansiedad, el control central del dolor, la ingesta de alimentos, así como un gran número de funciones cognitivas (Role y Berg, 1996; Gotti y col., 1997; Lindstrom, 1997; Changeux y Edelman, 2001; Hogg y col., 2003).

Tabla 1.2. Subunidades que forman los nAChRs neuronales: funciones y principales localizaciones.

Subunidad	Función	Distribución tisular
$\alpha 2$	Recompensa	Núcleo olfatorio, NIP
$\alpha 3$	Transmisión ganglionar	Ganglios autónomos, corteza cerebral, ATV
$\alpha 4$	Analgesia, adicción a la nicotina	Cerebro
$\alpha 5$	Transmisión ganglionar	Ganglios autónomos, hipocampo, SN
$\alpha 6$	Modulación de la liberación de dopamina	LC, ATV, SN, neuronas DRG, cel. cromafines humanas y de mono
$\alpha 7$	Ansiedad, memoria	Hipocampo, amígdala, tálamo
$\alpha 8$	Transmisión colinérgica en retina	Retina y SNC (sólo en aves)
$\alpha 9$	Transmisión eferente coclear	Células ciliadas de la cóclea, queratinocitos, epitelio olfativo, linfocitos, cel. cromafines
$\alpha 10$	Transmisión eferente coclear	Linfocitos, epitelio olfativo, células ciliadas de la cóclea, cel. cromafines
$\beta 2$	Adicción a la nicotina, analgesia	Ganglios autónomos, tálamo, corteza cerebral
$\beta 3$	Actividad locomotora	LC, ATV, SN
$\beta 4$	Transmisión ganglionar	Ganglios autónomos, NIP

LC: *locus coeruleus*; ATV: área tegmental ventral; SN: sustancia negra; NIP: núcleo interpeduncular.

En el SNC de los mamíferos existe una distribución heterogénea de las subunidades $\alpha 2$ - $\alpha 7$ y $\beta 2$ - $\beta 4$ (Gotti y col., 2006). Las subunidades $\alpha 4$, $\beta 2$ y $\alpha 7$ son las más ampliamente expresadas. En contraste con la abundante información existente sobre el papel protagonista de los nAChRs en la neurotransmisión en la placa motora y en los ganglios simpáticos, son escasos los trabajos que atribuyan a los nAChRs una función relevante en la transmisión sináptica en el SNC. Existen, sin embargo, numerosas evidencias de que los nAChRs presinápticos cerebrales modulan la liberación de diversos neurotransmisores (la propia ACh, la noradrenalina (NA), la dopamina (DA), el glutamato o el GABA) (Grady y col., 1992; Wilkie y col., 1993; Clarke y Reuben, 1996; Yang y col., 1996; Alkondon y col., 1997; Wonnacott, 1997; Wonnacott y col., 2000), lo que ha llevado a la creencia de una localización mayoritariamente presináptica de los nAChRs del SNC (Wonnacott, 1997); no obstante, los nAChRs también se encuentran en regiones somatodendríticas. Actualmente

se considera que los nAChRs presinápticos y perisinápticos participan en la modulación de la actividad neuronal siendo activados de forma paracrina por la ACh (o la Cho, en el caso de los nAChRs $\alpha 7$) liberada por la actividad intensa y/o conjunta de múltiples neuronas (Dajas-Bailador y Wonnacott, 2004). Por su parte, los nAChRs localizados postsinápticamente participarían fundamentalmente en el control de la transmisión periférica a nivel ganglionar así como en la transmisión sináptica en el hipocampo y la corteza sensitiva (Jones y col., 1999).

Los nAChRs $\alpha 7$ se encuentran fundamentalmente en el hipocampo, localizándose en las interneuronas gabérgicas del *stratum oriens* y *radiatum* y en las neuronas piramidales. Además, los nAChRs $\alpha 7$ de localización presináptica están presentes en terminaciones glutamatérgicas y facilitan la liberación de este neurotransmisor en varias regiones cerebrales, incluyendo la corteza, el hipocampo y el área tegmental ventral (Mansvelder y McGehee, 2000; Jones y Wonnacott, 2004; Patti y col., 2006). Los nAChRs $\alpha 7$ median los efectos de la Nic sobre la potenciación perdurable (LTP) en el hipocampo (Welsby y col., 2006), lo que ha llevado a implicar a estos nAChRs en procesos de adquisición de memoria (Hoyle y col., 2006; Young y col., 2007) y a considerarlos como posibles dianas de fármacos con potencial aplicación en el tratamiento de alteraciones cognitivas asociadas a la enfermedad de Alzheimer y la esquizofrenia.

Los nAChRs $\alpha 4\beta 2$ presentan una elevada afinidad por la Nic, representando el 90% de los sitios de fijación de este alcaloide en el cerebro. Los nAChRs $\alpha 4\beta 2$ están implicados en la adicción a la nicotina –en ratones KO de cualquiera de las dos subunidades, $\alpha 4$ o $\beta 2$, del nAChR no se observa la conducta de autoadministración de Nic– así como en algunas formas de epilepsia nocturna del lóbulo frontal en las que se han identificado mutaciones en el segmento M2 de las subunidades $\alpha 4$ o $\beta 2$ con incremento de la función del receptor. Así mismo, en ratones KO para la subunidad $\alpha 4$ se ha observado una reducción de los efectos antinociceptivos de la Nic (Marubio y col., 1999; Picciotto y col., 2001; Raggenbass y Bertrand, 2002; Maskos, 2007).

Las subunidades $\alpha 6$ y $\beta 3$ se expresan predominantemente en las neuronas catecolaminérgicas en las que contribuyen a la formación de nAChRs de composición compleja, como el $\alpha 6\beta 2\beta 3$ y el $\alpha 4\alpha 6\beta 2\beta 3$ (Champtiaux y col., 2003). Se ha propuesto que la subunidad $\beta 3$ sería necesaria para el ensamblaje y estabilidad de los nAChRs que contienen la subunidad $\alpha 6$ (Gotti y col., 2005).

Los nAChRs $\alpha 3\beta 4$ y $\alpha 3\beta 2$ son los principales responsables de la transmisión sináptica en los ganglios autónomos (simpáticos y parasimpáticos) y median la mayoría de los efectos de la Nic sobre la presión arterial y la frecuencia cardíaca.

Los nAChRs $\alpha 9\alpha 10$ han sido identificados en diversos tejidos y órganos si bien su papel funcional no ha sido establecido en la mayoría de ellos; la principal excepción la constituye la cóclea donde median la transmisión sináptica entre las fibras olivococleares eferentes y las células ciliadas de la cóclea (Elgoyhen y col., 1994; Hiel y col., 2000; Elgoyhen y col., 2001; Luebke y col., 2005) (véase sección 1.2).

Dada la amplia distribución y diversidad de funciones en las que se ha implicado a las subunidades de los nAChRs neuronales, no es de extrañar que tanto una alteración en su número en áreas cerebrales concretas como diversas mutaciones en los genes que las codifican se hayan relacionado con el desarrollo de procesos patológicos del sistema nervioso como el síndrome de Tourette, la esquizofrenia, el autismo, la epilepsia, o las enfermedades de Parkinson y Alzheimer (Dursun y col., 1994; Steinlein y col., 1995; Leonard y col., 1996; Newhouse y col., 1997; Lee y col., 2002).

Los nAChRs neuronales están implicados en la señalización en células no neurales (queratinocitos, linfocitos, macrófagos, células endoteliales vasculares, epiteliales pulmonares e intestinales y astrocitos) en las que regulan procesos como la proliferación, la adhesión, la migración, la secreción y la supervivencia celular (Villablanca, 1998; Heeschen y col., 2001; Gotti y Clementi, 2004; Gahring y Rogers, 2005). Los nAChRs extraneuronales parecen estar implicados en la génesis de diversas neoplasias. Es el caso del carcinoma pulmonar de células pequeñas (estrechamente vinculado al hábito de fumar), cuyas células son capaces de sintetizar y liberar ACh al tiempo que expresan sitios de unión a la α -BgTx (Cattaneo y col., 1993; Quik y col., 1994; Schuller y Orloff, 1998). Además, la administración de Nic estimula la proliferación de células en cultivo derivadas de este carcinoma. Este efecto es dependiente de la entrada de Ca^{2+} y es bloqueado parcialmente por la α -BgTx (Maneckjee y Minna, 1990; Codignola y col., 1994). No se conoce aún el subtipo de nAChR implicado, aunque experimentos con antagonistas selectivos sugieren la presencia de nAChRs $\alpha 4\beta 2$ y $\alpha 7$ (Minna, 2003; West y col., 2003).

1.2. LOS nAChRs $\alpha 9^*$ Y $\alpha 10^*$

Las subunidades $\alpha 9$ y $\alpha 10$ fueron identificadas y clonadas de librerías de ADN del epitelio olfativo y de la cóclea de la rata, respectivamente (Elgoyhen y col., 1994; Elgoyhen y col., 2001). Los genes que codifican estas subunidades en el hombre (Chrna9 y Chrna10) se encuentran en los cromosomas 14 ($\alpha 9$; locus 14p11) y 1 ($\alpha 10$; locus 1q32). Ambos genes constan de cinco exones presentando una estructura exón-intrón muy diferente a la del resto de genes de los nAChRs (Boulter y col., 1990; Albuquerque y col., 2009).

Las subunidades $\alpha 9$ y $\alpha 10$ han sido localizadas en el epitelio sensitivo de la cóclea (células ciliadas internas y externas) y del laberinto (Elgoyhen y col., 1994; Lustig y col., 1999; Hiel y col., 2000; Elgoyhen y col., 2001; Luebke y col., 2005), bulbo olfativo (Elgoyhen y col., 1994; Keiger y Walker, 2000), ganglio del trigémino (Liu y col., 1998; Keiger y Walker, 2000), DRG (Lips y col., 2002), corazón (Dvorakova y col., 2005), placenta (Lips y col., 2005), linfocitos (Lustig y col., 2001; Peng y col., 2004), queratinocitos (Elgoyhen y col., 1994; Nguyen y col., 2000; Kurzen y col., 2004), parénquima pulmonar (Biallas y col., 2007), adipocitos (Liu y col., 2004), espermatozoides (Kumar

y Meizel, 2005), células endoteliales, músculo liso vascular (Bruggmann y col., 2002; Bruggmann y col., 2003), músculo esquelético de la lengua (Elgoyhen y col., 1994; Zuo y col., 1999; Elgoyhen y col., 2001) y células cromafines de la médula adrenal (Solís, 2006; Colomer y col., 2010); sin embargo, no han podido ser localizados en el SNC.

Las proteínas de las subunidades $\alpha 9$ y $\alpha 10$ tienen un peso molecular de 54,5 y 49,8 kDa y contienen 479 y 447 aminoácidos, respectivamente. Mientras que las demás subunidades α ($\alpha 1$ - $\alpha 8$) muestran homologías de secuencia entre el 48 y el 70%, la similitud existente con las subunidades $\alpha 9$ y $\alpha 10$ es inferior al 40%. Por su parte, la homología entre la subunidad $\alpha 9$ y la $\alpha 10$ es del 57% en la rata y del 53% en el hombre. La presencia de dos cisteínas adyacentes ($\alpha 9$ Cys197 y $\alpha 9$ Cys198; $\alpha 10$ Cys217 y $\alpha 10$ Cys218 secuencia de la rata) homólogas a Cys192 y Cys193 de la subunidad $\alpha 1$ del pez *Torpedo* y su característica estructura secundaria –cuatro segmentos transmembrana y un gran dominio N-terminal extracelular– permitieron la adscripción de las subunidades $\alpha 9$ y $\alpha 10$ a la superfamilia *Cys-loop* de canales iónicos activados por ligando y, en virtud de su sensibilidad farmacológica, a la familia de los nAChRs. No obstante, desde el punto de vista filogenético las subunidades $\alpha 9$ y $\alpha 10$ constituirían un grupo independiente tanto de los nAChRs musculares como de los nAChRs neuronales (**Figura 1.13**).

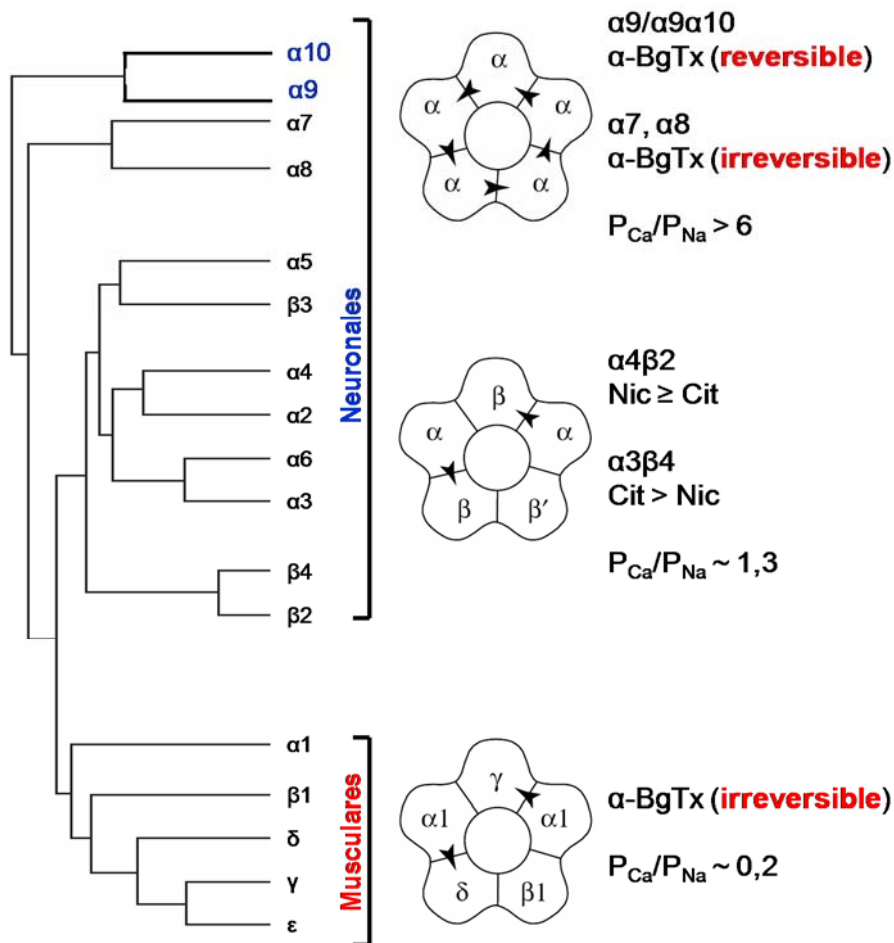


Figura 1.13. Árbol filogenético de las 17 subunidades conocidas de los nAChRs. Se muestra también la localización anatómica, estequiometría, sensibilidad a fármacos y permeabilidad al Ca^{2+} (P_{Ca}/P_{Na}) de los principales nAChRs. Las puntas de flecha representan los sitios de unión a la ACh. α -BgTx: α -bungarotoxina; Cit: citisina; Nic: nicotina (Tomada de (Cordero-Erausquin y col., 2000)).

La secuencia de la subunidad $\alpha 9$ difiere en algunos aminoácidos de la del resto de las subunidades α . Así, los residuos hidrofóbicos Phe105 y Val236, conservados en todas las subunidades α , son sustituidos por Ser105 y Ser236 en la subunidad $\alpha 9$. Otra diferencia importante es la sustitución de Lys150 (cargado positivamente), presente en todas las subunidades α , por Thr150 (residuo no cargado) en la subunidad $\alpha 9$ (Elgoyhen y col., 1994). No se han descrito isoformas de procesamiento alternativo de la subunidad $\alpha 10$, pero sí de la subunidad $\alpha 9$. En la cóclea de pollo se ha identificado una isoforma de la subunidad $\alpha 9$ producida por la supresión de 132 pares de bases que codifican 44 aminoácidos situados en la región N-terminal, que abarca el sitio de unión de la ACh. Aunque no se conoce su significado funcional se especula con la posibilidad de que pudiera actuar como subunidad estructural en nAChRs heteroméricos en los que también estaría presente la subunidad $\alpha 9$ normal (Hiel y col., 2000). Asimismo, distintas isoformas de la subunidad $\alpha 9$ se han

asociado a un aumento del riesgo de aparición de cáncer de pulmón (Chikova y Grando, 2011) y cuello uterino (Calleja-Macias y col., 2012).

Al ser expresadas en ovocitos de *Xenopus laevis* las subunidades $\alpha 9$ pueden combinarse entre sí formando nAChRs homoméricos funcionales (Elgoyhen y col., 1994). Sin embargo, la coinyección de ARNm de las subunidades $\alpha 9$ y $\alpha 10$ se asocia a la aparición de corrientes de magnitud 1.000 veces superior a las observadas tras la expresión en solitario de la subunidad $\alpha 9$, lo que indicaría que los dos tipos de subunidades se combinan para constituir nAChRs heteroméricos funcionales. Por su parte, no se ha podido demostrar que la subunidad $\alpha 10$ forme nAChRs homoméricos (Elgoyhen y col., 2001; Sgard y col., 2002). El hecho de que las subunidades $\alpha 9$ y $\alpha 10$ se expresen en muchas de las estructuras donde han sido detectadas sugiere que pueden asociarse para dar lugar a nAChRs $\alpha 9\alpha 10$ nativos (Lips y col., 2002; Gómez-Casati y col., 2005).

El nAChR $\alpha 9\alpha 10$ recombinante presenta propiedades farmacológicas y biofísicas prácticamente idénticas a las del nAChR que media la transmisión sináptica entre las fibras olivococleares eferentes y las células ciliadas de la cóclea, donde las únicas subunidades de los nAChRs que se expresan son la $\alpha 9$ y la $\alpha 10$. Nuestro conocimiento de la estequiometría de los nAChRs $\alpha 9\alpha 10$ se basa fundamentalmente en los resultados de experimentos de sustitución mediante mutagénesis dirigida de la valina en la posición 13 del segmento M2 de ambas subunidades por una treonina. Dicha mutación incrementa la sensibilidad del receptor a la ACh, lo que se traduce en un desplazamiento hacia la izquierda de la curva concentración-respuesta proporcional al número de subunidades mutadas. Así mismo, el hecho de que la concentración efectiva 50 (CE₅₀) de la ACh sobre los nAChRs resultantes de la inyección en ovocitos de *Xenopus laevis* de ARNm de las subunidades $\alpha 9$ y $\alpha 10$ en una proporción 2:3 sea idéntica a la de los nAChRs nativos de las células ciliadas de la cóclea, sugiere que la composición de estos últimos es la de $(\alpha 9)_2(\alpha 10)_3$. Por analogía con la disposición de subunidades propuesta para el nAChR muscular ($\alpha 1\gamma\alpha 1\beta 1\delta$) y el neuronal $\alpha 4\beta 2$ ($\alpha 4\beta 2\alpha 4\beta 2$), se postula que el complejo $\alpha 9\alpha 10$ presentaría el siguiente orden de subunidades: $\alpha 9\alpha 10\alpha 9\alpha 10\alpha 10$ (Plazas y col., 2005).

Los nAChRs homoméricos $\alpha 9$ y los heteroméricos $\alpha 9\alpha 10$ presentan una farmacología peculiar entre los nAChRs, ya que, además de ser activados por el agonista muscarínico Oxo-M, son los únicos nAChRs inhibidos por la Nic; así mismo, pueden ser bloqueados por sustancias tan diversas como la muscarina (CI_{50($\alpha 9$)} de 75 μ M; CI_{50($\alpha 9\alpha 10$)}: 41 μ M), la estricnina (CI_{50($\alpha 9$)} de 18 nM; CI_{50($\alpha 9\alpha 10$)} de 20 nM), la bicuculina (CI_{50($\alpha 9$)} de 0,8 μ M; CI_{50($\alpha 9\alpha 10$)} de 1 μ M), el tropisetron (CI_{50($\alpha 9\alpha 10$)} de 70 nM), el ondansetrón (CI_{50($\alpha 9\alpha 10$)} de 0,6 μ M), la atropina (CI_{50($\alpha 9/\alpha 9\alpha 10$)} de 1 μ M), el [5,5',5'',5'''-(1,2,4,5-benzonetetralil) tetrakis-[1-(3-fenilpiridinium)-4-pentine] tetrabromado] (ZZ-204G; (CI_{50($\alpha 9\alpha 10$)} de 0.51 nM), la α -BgTx (de forma reversible; CI_{50($\alpha 9$)} de 2,1 nM; CI_{50($\alpha 9\alpha 10$)} de 14 nM), la MLA (CI_{50($\alpha 9$)} de 1nM) y la α -RgIA (CI_{50($\alpha 9/\alpha 9\alpha 10$)} de 5 nM) (Elgoyhen y col., 1994; Verbitsky y col., 2000; Elgoyhen y col., 2001; Sgard y col., 2002; Rothlin y col., 2003; Ellison y col., 2006). Los

nAChRs $\alpha 9$ homoméricos y los heteroméricos $\alpha 9\alpha 10$ no presentan marcadas diferencias en sus perfiles farmacológicos, excepto una sensibilidad 10 veces superior del nAChR $\alpha 9\alpha 10$ al efecto bloqueante de la Nic ($CI_{50(\alpha 9)}$ de 31,5 μM ; $CI_{50(\alpha 9\alpha 10)}$ de 3,9 μM) (Elgoyhen y col., 2001).

En el año 2006 el grupo de Michael McIntosh (Universidad de Utah) revolucionó la farmacopea de los nAChRs $\alpha 9\alpha 10$ mediante el descubrimiento de la α -RgIA (Ellison y col., 2006). Se trata de un péptido de 13 aminoácidos, sintetizado por el caracol *Conus regius*, que presenta una extraordinaria potencia y selectividad para bloquear las respuestas mediadas por los nAChRs $\alpha 9\alpha 10$ de rata tanto recombinantes (expresados en ovocitos) como nativos (células del epitelio sensitivo de la cóclea). Así, la CI_{50} sobre los nAChRs $\alpha 9\alpha 10$ (5 nM) es tres órdenes de magnitud inferior a la que presenta sobre los nAChRs $\alpha 7$. Además, sobre los nAChRs $\alpha 3\beta 2$ y $\alpha 3\beta 4$ tendría una CI_{50} superior a 10 μM . Curiosamente, la potencia de la α -RgIA para bloquear el nAChR $\alpha 9\alpha 10$ humanos es dos órdenes de magnitud inferior (CI_{50} de 490 nM) que la que muestra sobre su ortólogo en la rata. Dicha sensibilidad diferencial estibaría en la presencia de una isoleucina en posición 56 de la subunidad $\alpha 9$ humana en vez de una treonina en la de la rata (Azam y McIntosh, 2012).

A partir de estudios de modelización molecular de los nAChRs $\alpha 9\alpha 10$ basados en la estructura cristalina del dominio extracelular de la subunidad $\alpha 9$ humana (Zouridakis y col., 2014) y de a estructura en solución de la α -RgIA (Ellison y col., 2008) se han identificado los aminoácidos responsables de la unión de la α -RgIA al nAChR $\alpha 9\alpha 10$ de rata (Azam y col., 2015). Considerando que la estequiometría de este receptor es $(\alpha 9)_2(\alpha 10)_3$, existirían dos sitios de unión a la toxina ubicados en las interfases entre las subunidades $\alpha 10$, que aportarían el componente principal, y $\alpha 9$, que aportarían el componente complementario (interfase $\alpha 10\alpha 9$). Glu197 y Pro200 en la subunidad $\alpha 10$, y Thr61 y Asp121 en la $\alpha 9$ formarían parte del sitio de unión en el receptor. Por su parte, Arg7, Arg9 y Arg11 de la α -RgIA serían críticos para la unión de este fármaco a los nAChRs $\alpha 9\alpha 10$ (**Figura 1.14**). A diferencia de la α -RgIA, la MLA y la α -BgTx se unirían al nAChR $\alpha 9\alpha 10$ en la interfase interfase $\alpha 9\alpha 10$ en la que la subunidad $\alpha 9$ aporta el componente principal del sitio de unión y la $\alpha 10$ el complementario (Zouridakis y col., 2014). Tanto la α -RgIA como la MLA y la α -BgTx se comportarían como antagonistas competitivos de los nAChRs dado que la ACh se une con elevada afinidad a las dos interfaces ($\alpha 9\alpha 10$ y $\alpha 10\alpha 9$) entre las subunidades $\alpha 9$ y $\alpha 10$.

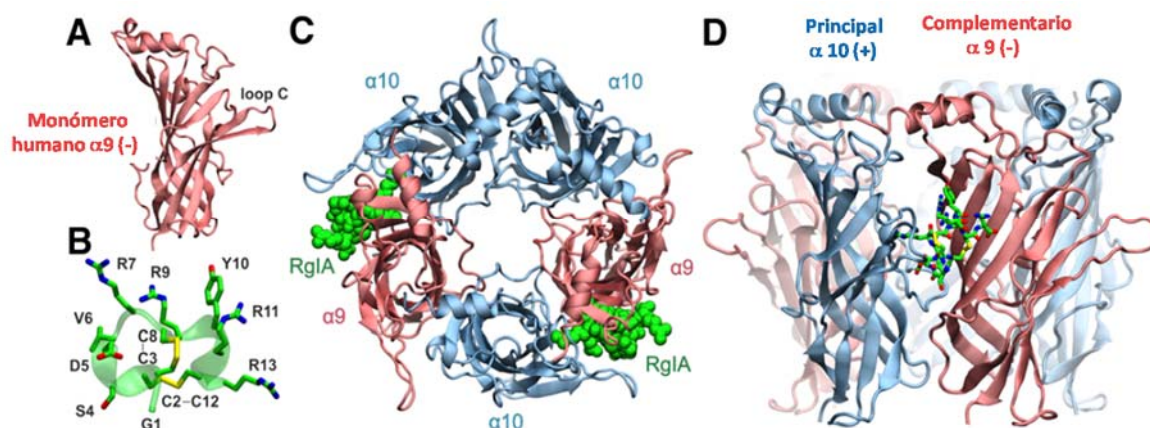


Figura 1.14. Imagen del dominio extracelular del nAChR $\alpha 9\alpha 10$ y del complejo formado la α -RgIA. **A.** Estructura del dominio extracelular de la subunidad $\alpha 9$ obtenida mediante difracción de rayos X. **B.** Imagen de la estructura de la α -RgIA obtenida mediante resonancia magnética nuclear. **C.** Modelo molecular del complejo formado por el nAChR $\alpha 9\alpha 10$ y la α -RgIA. **D.** Vista de perfil del complejo. La subunidad $\alpha 10$ aportaría el componente principal del sitio de unión de la α -RgIA al nAChR $\alpha 9\alpha 10$, mientras que la subunidad $\alpha 9$ aportaría el sitio complementario (Tomada de (Azam y col., 2015)).

El nAChR $\alpha 9$ homomérico y el heteromérico $\alpha 9\alpha 10$ expresados en ovocitos de *Xenopus laevis* son altamente permeables al Ca^{2+} ($P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}} \approx 9$) (Katz y col., 2000). Gomez-Casati y col. (2005) determinaron que la $P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}}$ del receptor nativo de las células ciliadas de la cóclea de la rata es de 8 y, más recientemente, Fucile y col. (2006) han estimado que la entrada fraccional de Ca^{2+} (Pf) a través del nAChR $\alpha 9\alpha 10$ de la rata expresado en células hipofisarias GH4C1 es del 22% (2 mM Ca^{2+} y 2 mM Mg^{2+} extracelular). La elevada permeabilidad al Ca^{2+} de estos receptores sugiere que su función está primariamente relacionada con la promoción de la entrada de dicho catión y la señalización celular por Ca^{2+} . No obstante, dada su amplia distribución tisular cabe pensar que el papel funcional que, en última instancia, desempeñen dependerá del tipo celular en el que se expresen. Este significado funcional es bien conocido para el receptor presente en las células ciliadas de la cóclea aunque es prácticamente desconocido en otras localizaciones.

Los cationes divalentes presentes en el medio extracelular modulan la actividad de los nAChRs $\alpha 9$ y $\alpha 9\alpha 10$ ejerciendo efectos diversos (Katz y col., 2000). Así, el Ca^{2+} y el Ba^{2+} , a concentraciones en el rango micromolar, bloquean los nAChRs $\alpha 9$ tanto a nivel macroscópico como microscópico (Decker y Dani, 1990; Vernino y col., 1992; Katz y col., 2000), mientras que ejercen un efecto dual sobre los nAChRs $\alpha 9\alpha 10$: potenciador a concentraciones menores de 0,5 mM e inhibidor a concentraciones superiores (McNiven y col., 1996). Cabe destacar que los nAChRs $\alpha 9$ y $\alpha 9\alpha 10$ serían más sensibles que otros nAChRs (muscular y neuronales) al efecto bloqueante del Ca^{2+} , ya que éste predomina incluso a concentraciones submilimolares (0,8 mM) cuando en los demás se observa solo a concentraciones superiores a las fisiológicas (> 1 mM). Atendiendo a esta

característica, el mecanismo de permeación y selectividad iónica de los nAChRs $\alpha 9$ y $\alpha 9\alpha 10$ sería similar al descrito para los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (Ca_v) (McCleskey, 1994). Además, ambos receptores son bloqueados por Mg^{2+} , que muestra una CI_{50} comprendida entre 0,2 mM (Gómez-Casati y col., 2005) y 0,38 mM (Weisstaub y col., 2002) cuando la concentración extracelular de Ca^{2+} es de 0,5 mM. El bloqueo por cationes divalentes se ejerce en el interior del poro iónico por lo que manifiesta dependencia de voltaje, siendo mayor al hiperpolarizar la membrana que al despolarizarla. Por otro lado, la potenciación por Ca^{2+} se atribuye a un cambio de la afinidad aparente del nAChR por la ACh (Mulle y col., 1992), sin incremento de la respuesta a concentraciones saturantes (1 mM) del agonista (Weisstaub y col., 2002). Este tipo de efecto, que se observa con diferentes tipos $-\alpha 1$, $\alpha 2\beta 2$, $\alpha 3\beta 4$, $\alpha 3\beta 2$, $\alpha 4\beta 4$, $\alpha 7-$ de nAChRs (Mulle y col., 1992; Vernino y col., 1992; Galzi y col., 1996; Booker y col., 1998; Zhang y col., 1999), se ejerce extracelularmente –es independiente de la entrada de Ca^{2+} y del potencial de membrana– y en algunos tejidos conlleva también un aumento de la eficacia del agonista (aumento de la probabilidad de apertura de los nAChRs de las células cromafines bovinas y neuronas simpáticas del ganglio cervical superior de la rata (Amador y Dani, 1995) y de la habénula (Mulle y col., 1992).

1.2.1. Función del nAChR $\alpha 9\alpha 10$ en las células ciliadas de la cóclea

Las células ciliadas de la cóclea de los vertebrados tienen la capacidad de detectar estímulos acústicos y, a través del movimiento de sus estereocilios –cada una posee unos 100 estereocilios–, traducirlos en señales eléctricas. En los mamíferos hay dos tipos de células ciliadas involucradas en este proceso: las internas y las externas (**Figura 1.15**). Las células ciliadas internas forman una única hilera y actúan como transductores primarios generando señales que mediante las fibras nerviosas aferentes, vía ganglio espiral, alcanzan la corteza auditiva. Por su parte, las células ciliadas externas forman tres hileras, están inervadas por fibras colinérgicas eferentes de la vía olivococlear media y su función principal es la de incrementar la magnitud de las vibraciones de la membrana basilar (traducción inversa, electro-mecánica: los cambios en el potencial de membrana inducen cambios en la morfología de estas células) favoreciendo la detección del sonido por las células ciliadas internas; así mismo, participarían en procesos de filtrado/discriminación de las diferentes frecuencias acústicas respecto al ruido de fondo. La activación de la vía olivococlear inhibe la motilidad de las células ciliadas externas disminuyendo su capacidad para amplificar el sonido con la consiguiente elevación de los umbrales de audición. (Blanchet y col., 1996; Fuchs, 1996; Sziklai, 2004). Se ha propuesto que activación de la vía olivococlear constituiría un mecanismo de protección frente al daño sónico (Luebke y Foster, 2002; Lustig, 2006).

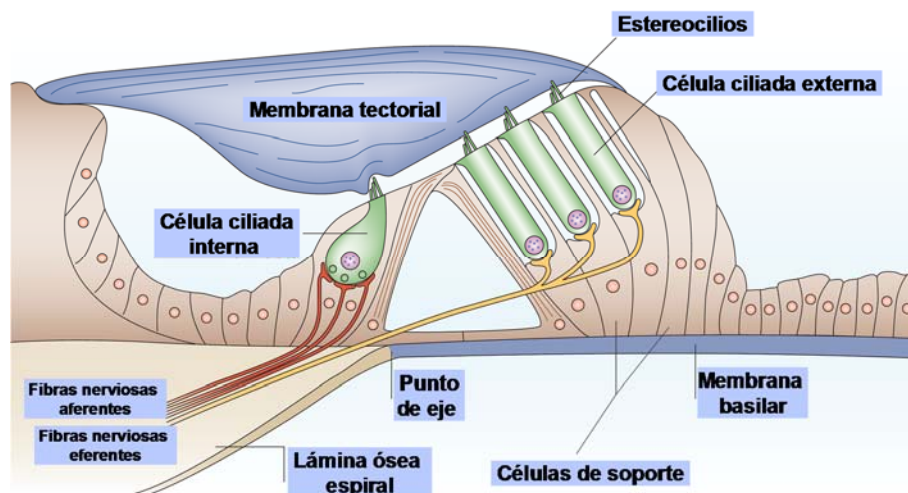


Figura 1.15. Representación esquemática de un corte sagital del órgano de Corti de la cóclea. La cóclea convierte el sonido en señales eléctricas. Este papel es desempeñado por las células ciliadas que se despolarizan en respuesta a la vibración de la membrana basilar. Las vibraciones de la membrana basilar son consecuencia de los cambios de presión de la endolinfa iniciados a nivel de la ventana oval que, a su vez, transmite las vibraciones de la membrana timpánica (Fettiplace y Hackney, 2006).

A grandes rasgos, el proceso de transducción de la señal acústica en nerviosa se inicia cuando el estímulo auditivo alcanza la cóclea provocando la deflexión de los estereocilios de las células ciliadas internas, lo que conduce a la activación de canales de K^+ ; como consecuencia de ello, se produce la entrada de K^+ y la despolarización celular con la consiguiente entrada de Ca^{2+} a través de canales dependientes de voltaje y la liberación exocitótica de glutamato, que activa las fibras aferentes del nervio acústico (**Figura 1.16A**). La actividad de la vía olivococlear hiperpolariza las células ciliadas externas reduciendo la señalización aferente por supresión del movimiento de la membrana basilar.

Los nAChRs expresados por las células ciliadas internas y externas son exclusivamente de los tipos $\alpha 9$ y $\alpha 9\alpha 10$. Aunque los nAChRs $\alpha 9$ homoméricos son funcionales *in vitro*, muy diversas evidencias experimentales sugieren que los efectos de las fibras colinérgicas de la vía olivococlear están mediados por nAChRs $\alpha 9\alpha 10$. La activación de estos nAChRs por la ACh liberada por los axones eferentes da lugar a la entrada de Ca^{2+} que abre canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} y pequeña conductancia iónica del tipo 2 (canales SK2) (Blanchet y col., 1996; Nenov y col., 1996; Morley y col., 1998; Oliver y col., 2000; Nie y col., 2004). En este proceso puede participar también la liberación de Ca^{2+} desde depósitos intracelulares mediante el mecanismo de liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} (CICR) (Jagger y col., 2000; Lioudyno y col., 2004). La apertura de los canales SK2 conlleva la hiperpolarización de la membrana celular (**Figura 1.16B**), lo que supone que los nAChRs $\alpha 9\alpha 10$ sean los únicos nAChRs conocidos que ejercen una función inhibitoria de la

señalización eléctrica celular. La subunidad $\alpha 9$ se expresa tanto en las células ciliadas internas como en las externas adultas de la rata. Sin embargo, a partir del día 12 de vida extrauterina, la subunidad $\alpha 10$ y los canales SK2 desaparecen de las células ciliadas internas, lo que prácticamente abole la transmisión colinérgica inhibitoria a ese nivel (Morley y Simmons, 2002; Katz y col., 2004).

El conocimiento actual del papel que juegan los nAChRs $\alpha 9$ y $\alpha 9\alpha 10$ en la audición y en el desarrollo de la cóclea deriva en gran medida del empleo de ratones KO para las subunidades $\alpha 9$ (Vetter y col., 1999) y $\alpha 10$ (Vetter y col., 2007). En los ratones KO para la subunidad $\alpha 9$ ($\alpha 9$ KO), la mayoría de las células ciliadas externas aparecen inervadas por una gran terminación en vez de múltiples terminaciones pequeñas como en los ratones silvestres. Además, los ratones $\alpha 9$ KO muestran una alteración de la supresión de las respuestas cocleares (*distortion product otoacoustic emissions*, dpoe) durante la activación de las fibras eferentes (Vetter y col., 1999). Ambas observaciones implican a la subunidad $\alpha 9$ tanto en la maduración de la conectividad sináptica entre las fibras olivococleares eferentes y las células ciliadas como en la adquisición de una función auditiva normal. Por otro lado, en los ratones KO para la subunidad $\alpha 10$ ($\alpha 10$ KO) se ha observado la desorganización de la inervación eferente de las células ciliadas internas y externas así como alteraciones de la morfología de estas últimas. Desde el punto de vista funcional, es de destacar que la administración exógena de ACh induce pequeñas corrientes sólo en las células ciliadas externas – no así en las internas– procedentes de animales con 8-9 días de vida extrauterina. Sin embargo, en los ratones $\alpha 10$ KO, la estimulación de las fibras olivococleares no suprime los dpoe, sugiriendo que los nAChRs $\alpha 9$ homoméricos residuales expresados por las células ciliadas externas no son capaces de transducir señales eferentes *in vivo* (Vetter y col., 2007). Todos estos resultados apuntan a que si bien los nAChRs $\alpha 9$ homoméricos son funcionales *in vitro*, los efectos de las fibras colinérgicas de la vía olivococlear están mediados por nAChRs $\alpha 9\alpha 10$.

Los nAChRs $\alpha 9\alpha 10$ están modulados directamente por compuestos opioides que actúan como cotransmisores en la vía olivococlear (Lioudyno y col., 2002). Además, estos nAChRs son bloqueados por compuestos ototóxicos como los antibióticos aminoglucósidos (estreptomicina y gentamicina) (Blanchet y col., 2000; Rothlin y col., 2000) y algunos antimaláricos (quinina, quinidina y cloroquina) (Ballester y col., 2005).

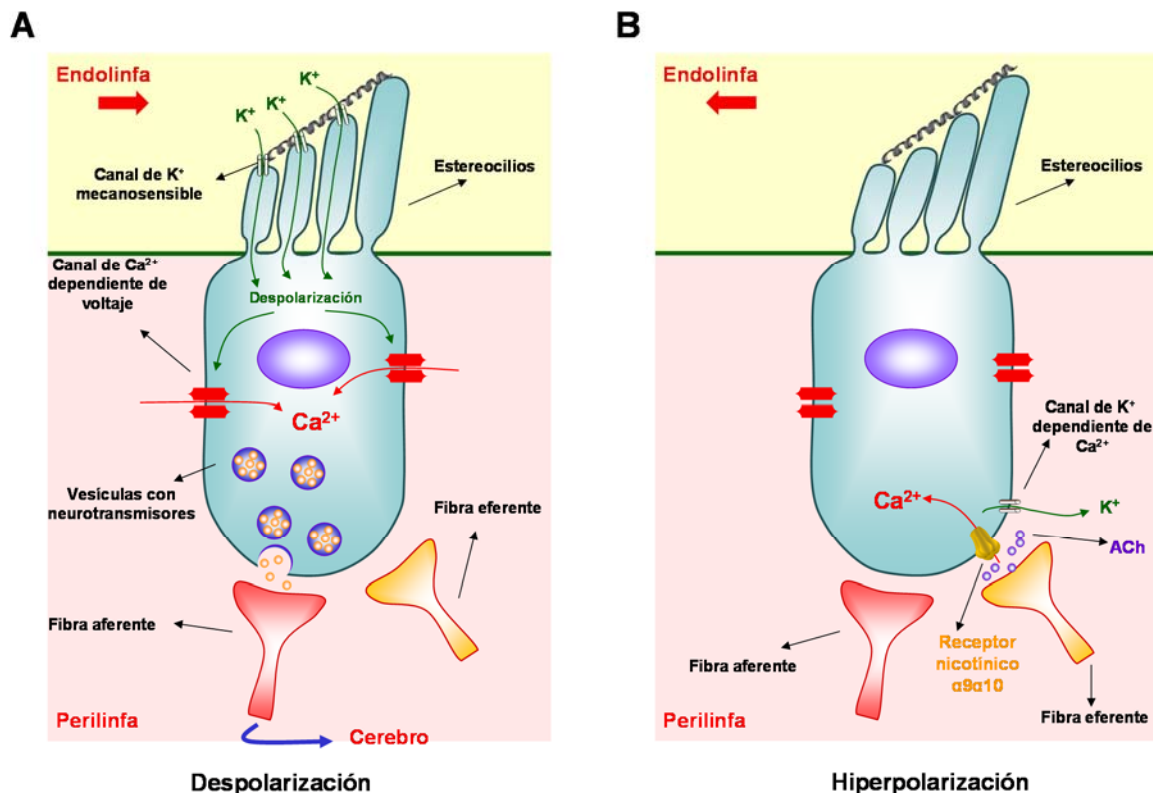


Figura 1.16. Transducción de las señales acústicas por las células ciliadas de la cóclea. **A.** La vibración de la membrana basilar induce el desplazamiento de los filamentos que unen los estereocilios de las células ciliadas produciendo la apertura de canales de K^+ mecanosensibles, la entrada de K^+ desde la endolinfa (tiene un alto contenido en K^+ y bajo en Na^+) y la despolarización celular con la consiguiente entrada de Ca^{2+} a través de canales dependientes de voltaje y la liberación exocitótica de glutamato que activa las fibras aferentes del nervio acústico. **B.** La liberación de ACh por las terminaciones de las fibras eferentes activa los nAChRs $\alpha 9\alpha 10$ acoplados a canales SK, originando la salida de K^+ al exterior y la hiperpolarización de la célula.

1.2.2. Implicaciones fisiopatológicas del nAChR $\alpha 9^*$

El hecho de que la administración de la α -RgIA y de la conotoxina Vc1.1 (ACV1), otro antagonista de los nAChRs $\alpha 9^*$, produzca analgesia en modelos animales de dolor neuropático (constricción crónica del nervio ciático) e inflamatorio (inyección podal de formalina), llevó hace algunos años a sugerir la participación de los nAChRs $\alpha 9^*$ en la fisiopatología de la sensación dolorosa y a intentar validarlos como diana de nuevos fármacos analgésicos (Satkunanathan y col., 2005; Vincler y col., 2006; Vincler y McIntosh, 2007; McIntosh y col., 2009). Éste último aspecto ha sido objeto de controversia a raíz de los estudios del grupo de David Adams en la Universidad de Queensland (Callaghan y col., 2008; Klimis y col., 2011). Dichos estudios daban fe de la capacidad de ambas toxinas para comportarse como agonistas de los receptores GABA_B, presentes en las neuronas DRG, y, consiguientemente, inhibir los canales de Ca^{2+} de tipo N. Esta controversia ha sido en buena medida superada gracias a la obtención de antagonistas no peptídicos de los nAChRs $\alpha 9^*$,

como el derivado azaromático cuaternario ZZ204G, que reproducen el efecto analgésico de los antagonistas peptídicos al tiempo que carecen de afinidad por el receptor GABA_B (Holtman y col., 2011; Zheng y col., 2011). El mecanismo de la acción analgésica de estos compuestos es insuficientemente conocido. La ligadura parcial (constricción) del nervio ciático con hilo crómico comporta una reacción inflamatoria local dependiente, entre otros factores, de la acumulación de linfocitos que expresan colina acetilasa y, por ello, constituyen una fuente local de ACh que activaría los nAChRs $\alpha 9^*$ presentes en diversas poblaciones linfocitarias (Peng y col., 2004). La α -RgIA y la ACV1 reducen significativamente el número de linfocitos y macrófagos en el área de la lesión nerviosa, por lo que su acción analgésica ha sido atribuida a un efecto inmodulador. Debe señalarse, no obstante, que tanto los antagonistas peptídicos como los no peptídicos de los nAChRs $\alpha 9^*$ son capaces de producir analgesia frente a formas de dolor crónico, como el inducido por la administración subcutánea de formalina, que obedecen a un fenómeno de sensibilización central (a nivel de la médula espinal) de la vía nociceptiva. Esta circunstancia y el hecho que la subunidad $\alpha 9$ se exprese en neuronas DRG (Lips y col., 2002), plantean la posibilidad de que los antagonistas de los nAChRs $\alpha 9^*$ puedan producir su acción analgésica actuando también sobre las terminaciones y/o el soma de estas neuronas.

Una limitación en el empleo de las α -conotoxinas como cabeza de serie en el desarrollo de fármacos analgésicos es la de ser 300 veces menos potentes sobre el receptor nAChR $\alpha 9\alpha 10$ humano (CI₅₀ de la α -RgIA de 494 nM) que sobre el de la rata (CI₅₀ de 1.5 nM) (Azam y McIntosh, 2012). Estos resultados indican que las características moleculares del nAChR $\alpha 9^*$ de la especie destino deben ser tenidas en cuenta al desarrollar fármacos analgésicos que tengan a este nAChR como diana.

El nAChR $\alpha 9$ ha sido también implicado en otros procesos patológicos. Es el caso del pénfigo maligno, una enfermedad de la piel en la que se ha descrito la existencia de anticuerpos dirigidos contra el nAChR $\alpha 9$ (Nguyen y col., 2000). Además, el nAChR $\alpha 9$ regula la migración y adhesión de los queratinocitos, lo que podría dar pie al desarrollo de fármacos selectivos que favorecieran la epitelización de heridas (Chernyavsky y col., 2007). El nAChR $\alpha 9$ se expresa también en tumores de mama (Lee y col., 2010; Lee y col., 2011), en los que estimula el crecimiento (Tu y col., 2011). Por último, un polimorfismo de nucleótido único en posición 442 del gen que codifica la subunidad $\alpha 9$ ha sido asociado al incremento del riesgo de cáncer de pulmón humano (Chikova y col., 2012).

1.3. LOS nAChRs $\alpha 7$

La subunidad $\alpha 7$ fue aislada del SNC del pollo (Conti-Tronconi y col., 1985) e identificada por Couturier en 1990. Posteriormente fue clonada a partir de cADN del mismo tejido (Schoepfer y col., 1990). El gen que codifica la subunidad $\alpha 7$ en el hombre (Chrna7) se localiza en el cromosoma 15 (locus 15q14). Este gen se organiza en 10 exones, de forma que los exones 7-10 codifican los cuatro dominios transmembrana, y los exones 2-6 el dominio extracelular que incluye el sitio de unión a ligandos (Boyd, 1997; Colquhoun y Patrick, 1997; Lloyd y Williams, 2000). La subunidad $\alpha 7$ tiene un tamaño molecular de 56 kDa y está compuesta por 502 aminoácidos, incluyendo los 22 aminoácidos del péptido señal localizado en el extremo N-terminal (Galzi y col., 1991; Bertrand y col., 1993). Se han descrito 6 isoformas diferentes generadas por ajuste alternativo del gen del nAChR $\alpha 7$ en cerebro humano y en leucocitos (Gault y col., 1998; Villiger y col., 2002; Gault y col., 2003; Severance y col., 2004), aunque es probable que algunas de ellas no sean capaces de dar lugar a proteínas funcionales (Villiger y col., 2002; Severance y col., 2004).

Los nAChRs formados por la subunidad $\alpha 7$ han sido identificados en el SNC y SNP (Sargent, 1993; McGehee y Role, 1995). A nivel del SNC se encuentran fundamentalmente en el hipocampo, localizándose en las interneuronas GABAérgicas del *stratum oriens* y *radiatum* y en las neuronas piramidales. En el SNP se localizan en los ganglios vegetativos (ciliar, parasimpático cardiaco, cervical superior, etc.) (Zhang y col., 1996; Chang y Berg, 1999; Bunker y Nishi, 2002) y en las células cromafines de la glándula adrenal bovina (García-Guzmán y col., 1995), de rata (Martin y col., 2003; Colomer y col., 2010) y humana (Pérez-Álvarez y col., 2011). Así mismo, su presencia ha sido descrita en células del sistema inmune como los macrófagos (Wang y col., 2003; Galvis y col., 2006).

El nAChR $\alpha 7$ homomérico se caracteriza por su elevada permeabilidad al Ca^{2+} , una rápida desensibilización y por interaccionar de forma irreversible y con alta afinidad con la $\alpha\text{-BgTx}$ (Couturier y col., 1990; Bertrand y col., 1993; Seguela y col., 1993). Aunque *in vivo* la mayoría de los nAChRs $\alpha 7$ serían homoméricos, la subunidad $\alpha 7$ también es capaz de formar receptores heteroméricos funcionales con las subunidades $\beta 2$ en ovocitos de *Xenopus laevis* (Khiroug y col., 2002; Azam y col., 2003) y en el cerebro humano y de rata (Moretti y col., 2014).

Los nAChRs $\alpha 7$ de localización presináptica ejercen un efecto facilitador de la liberación de neurotransmisores contribuyendo a prevenir el fenómeno de depresión o fatiga de la transmisión sináptica (McGehee y Role, 1995; Gray y col., 1996; Coggan y Thompson, 1997). Aquellos que poseen una ubicación somática o somatodendrítica contribuyen a la generación de corrientes sinápticas en el cerebro (p. ej., en las interneuronas GABAérgicas del hipocampo de rata, con efectos moduladores de la transmisión de información en circuitos neuronales implicados en la ansiedad y la memoria; (Zhang y col., 1996; Ullian y col., 1997) y en los ganglios vegetativos (Rust y col., 1994; Chang y Berg, 1999; Bunker y Nishi, 2002). En las células cromafines de la médula adrenal, la

activación de los nAChRs $\alpha 7$ favorecería la entrada de Ca^{2+} al interior celular, aunque *per se* no desencadenaría la exocitosis de catecolaminas (CAs) (Pérez-Álvarez y col., 2011).

Los nAChRs $\alpha 7$ poseen una farmacología propia. El PNU-282987 es un agonista selectivo (no activa nAChRs $\alpha 3\beta 4$, $\alpha 4\beta 2$ y $\alpha 9\alpha 10$) de los nAChRs $\alpha 7$ tanto humanos como de la rata (Bodnar y col., 2005), en tanto que la Cho es un agonista puro que se diferencia de la ACh por su menor potencia y por inducir una respuesta que se activa e inactiva más rápidamente (Alkondon y col., 1997). La α -BgTx y la MLA son potentes antagonistas (CI_{50} de 1-10 nM) de los nAChRs $\alpha 7$ con los que interaccionan de forma irreversible y reversible, respectivamente (Couturier y col., 1990). La α -ArIB presenta una extraordinaria selectividad frente a los nAChRs $\alpha 7$ con una K_i de 7,04 nM para desplazar a la [I^{125}] α -BgTx de membranas de hipocampo de ratón y una CI_{50} de 1 nM para inhibir las corrientes inducidas por ACh en ovocitos de *Xenopus* que expresan heterológicamente nAChRs $\alpha 7$ (Whiteaker y col., 2007). La diferencia entre ambos valores se debe a la existencia de 5 sitios de unión a la toxina en la molécula del nAChR $\alpha 7$ homomérico bastando, sin embargo, la ocupación de sólo uno de ellos para obtener la inhibición funcional. A diferencia de otros bloqueantes de los nAChR $\alpha 7$, como la MLA o la α -BgTx, la α -ArIB no bloquea los nAChRs musculares (sensibles a α -BgTx) ni los $\alpha 6\beta 2$ (sensibles a MLA) (Mogg y col., 2002) o los $\alpha 9\alpha 10$ (sensibles a MLA y α -BgTx). Ello la convierte en una herramienta imprescindible para identificar los nAChRs $\alpha 7$ allí donde puedan coexistir con los nAChRs $\alpha 1$ (músculo esquelético denervado), los $\alpha 6\beta 2$ (zonas de proyección de la sustancia negra y del área tegmental ventral, tracto óptico) o los $\alpha 9\alpha 10$ (linfocitos, keratinocitos, neuronas DRG, células del epitelio sensitivo de la cóclea y células cromafines de la médula adrenal). Otra característica diferencial de esta toxina frente a la α -BgTx es su más rápida reversibilidad (K_d de $0,128 \text{ min}^{-1}$; $t_{1/2}$ reversión de 5,4 min).

Otra herramienta farmacológica disponible para la identificación de los nAChR $\alpha 7$ son los moduladores alostéricos, que pueden actuar de 2 formas: i) incrementando la amplitud de la respuesta, como es el caso de la ivermectina, el [2-[(4-fluorofenil)amino]-4-metil-5-tiazolil]-3-tienilmetanona (LY-2087101) y el 5-hidroxiindol, y ii) incrementando tanto la amplitud como la duración de la respuesta, como el PNU-120596 (CE_{50} de 216 nM) (Hurst y col., 2005). Es de destacar que los efectos de los moduladores alostéricos aparecen únicamente cuando se administran conjuntamente con un fármaco agonista. El modulador, PNU-120596, incrementa la potencia, la cooperatividad (el n° de Hill pasa de 2 a 4) y la eficacia de los agonistas puros, desplazando a la izquierda la curva concentración-respuesta y aumentando el efecto de concentraciones máximas de los agonistas, al tiempo que prolonga la duración de las corrientes. Este fármaco no modifica la selectividad iónica, la dependencia de voltaje o la conductancia unitaria del nAChR $\alpha 7$. Por el contrario, incrementa de forma dramática el tiempo medio de apertura de los mismos. Los efectos de este fármaco son duraderos pero reversibles.

1.4. LA GLÁNDULA ADRENAL

Las glándulas adrenales se encuentran localizadas en la zona anterior/ventral-superior/craneal de los riñones de los mamíferos, estando irrigadas por las arterias adrenal superior, media e inferior, que proceden de las arterias frénica, aorta y renal, respectivamente (Ehrhart-Bornstein y col., 1998). En la mayoría de las especies, la circulación venosa intraglandular confluye en las venas adrenolumbares derecha e izquierda que desembocan en las venas cava y renal, respectivamente.

En la glándula adrenal se pueden distinguir dos regiones, la corteza y la médula, claramente diferenciadas desde el punto de vista funcional.

1.4.1. Morfología de la glándula adrenal

1.4.1.1. La corteza adrenal

Se localiza en la periferia de la glándula y participa en la respuesta al estrés mediante la producción y liberación de corticosteroides. A tenor de sus efectos predominantes, los corticosteroides se clasifican en mineralocorticoides, representados básicamente por la aldosterona, glucocorticoides (GC), entre los que destacan el cortisol y la corticosterona (CORT), y esteroides sexuales, fundamentalmente de naturaleza androgénica.

Los corticosteroides se sintetizan a partir de un precursor común, el colesterol, el cual es sintetizado a partir de acetato o es captado por las células y vehiculado hasta la membrana mitocondrial interna por la proteína reguladora de la esteroidogénesis (*steroidogenic acute regulatory*; StAR). En la mitocondria, el colesterol es hidroxilado por la 20,22-desmolasa (CYP11A1), transformándose en pregnenolona. Una vez formada, la pregnenolona puede ser deshidrogenada y convertida en progesterona, o hidroxilada para dar lugar a 17- α -hidroxipregnenolona (Flórez, 2008). Estas reacciones pueden llevarse a cabo en cualquier tejido productor de esteroides, mientras que las transformaciones siguientes tienen lugar específicamente en las células de la corteza adrenal (**Figura 1.17**):

- 1) Progesterona \rightarrow desoxicorticosterona \rightarrow aldosterona.
- 2) Progesterona \rightarrow 17- α -hidroxiprogesterona \rightarrow desoxicortisol \rightarrow cortisol.
- 3) 17- α -hidroxiprogesterona \rightarrow androstenodiona \rightarrow testosterona.

En la corteza adrenal existen células especializadas en cada una de estas rutas biosintéticas, localizándose en tres zonas histológicamente bien definidas: la zona glomerulosa, la zona fasciculada y la zona reticular (**Figura 1.18**).

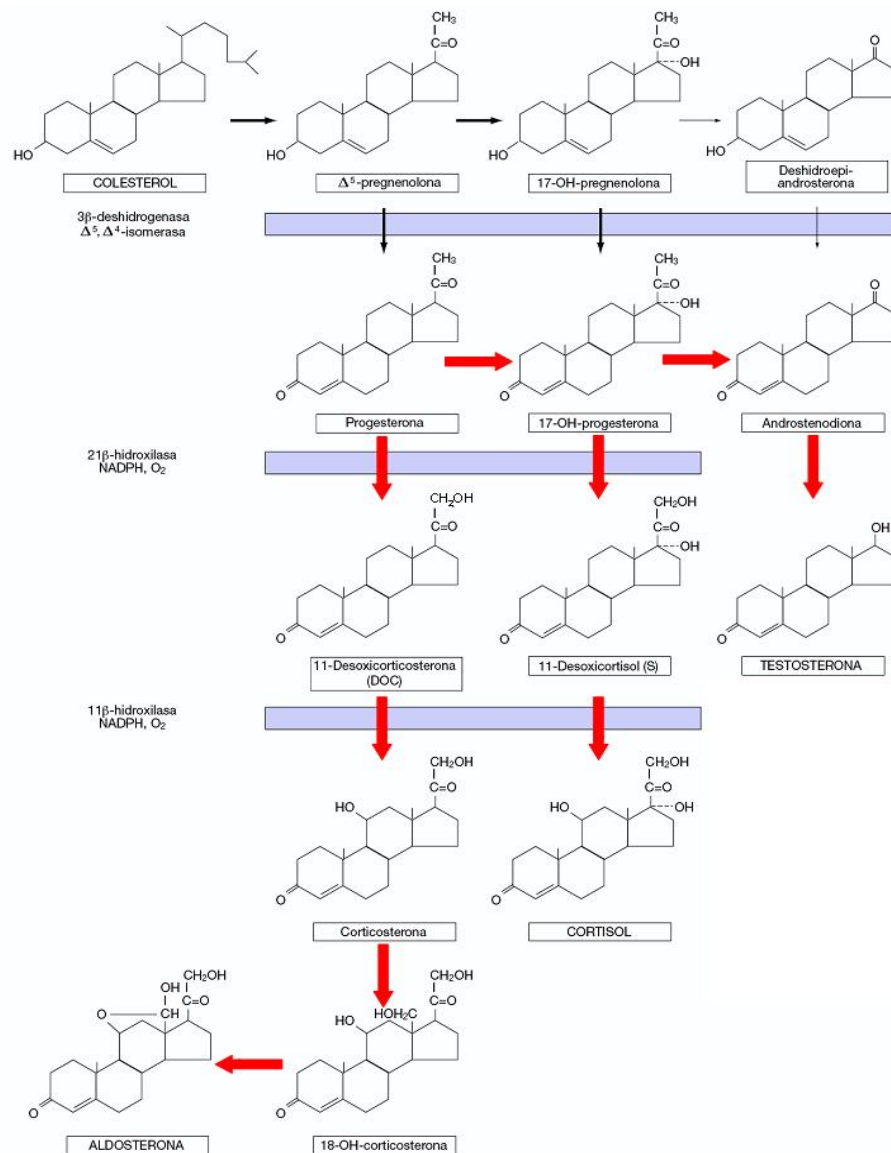


Figura 1.17. Rutas biosintéticas de los corticosteroides. Las flechas en rojo indican las transformaciones que ocurren específicamente en la corteza adrenal.

1.4.1.1.1. Zona glomerulosa

Constituye la porción externa de la corteza adrenal. Sus células, que funcionalmente se integran en el sistema renina-angiotensina-aldosterona, secretan mineralocorticoides en respuesta al incremento de la concentración plasmática de K⁺ o a la disminución del flujo sanguíneo renal (Ehrhart-Bornstein y col., 1998). La aldosterona actúa en el túbulo contorneado distal promoviendo la reabsorción de Na⁺ e incrementando la excreción de K⁺.

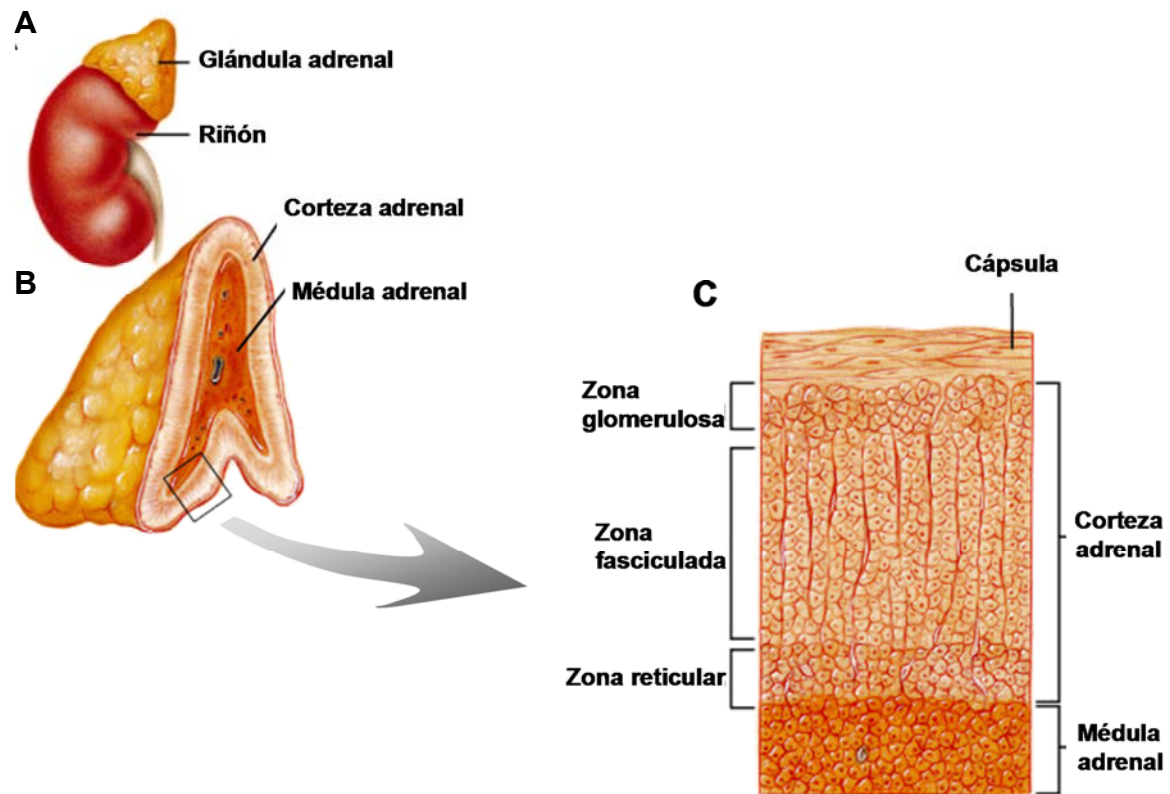


Figura 1.18. Anatomía e histología de la glándula adrenal. **A.** Localización anatómica. **B.** Corte sagital de la glándula adrenal. **C.** Estructura histológica.

1.4.1.1.2. Zona fasciculada

Comprendida entre las zonas glomerulosa y reticular, sus células son responsables de la producción de GC. Actúan como efectores primarios de la hormona adrenocorticotropa (ACTH), que se libera por la adenohipófisis en respuesta a dos hormonas de origen hipotalámico, la hormona liberadora de corticotropina (CRH) y la arginina-vasopresina (AVP).

Las células de la zona fasciculada forman parte de un sistema neuroendocrino conocido como eje hipotálamo-hipófisis-corteza suprarrenal (HPA) (Ehrhart-Bornstein y col., 1998). La ACTH estimula la producción y liberación de cortisol o CORT, que modifican el metabolismo de los distintos principios inmediatos al aumentar la proteólisis, la lipólisis y la gluconeogénesis y disminuir la utilización de la glucosa por las células del músculo esquelético y del tejido adiposo; como consecuencia de estas acciones, los GC incrementan los niveles plasmáticos de glucosa, aminoácidos y triglicéridos.

1.4.1.1.3. Zona reticular

Las células de la zona reticular se sitúan en la porción interna de la corteza, entrando en contacto con la región medular. Están especializadas en la síntesis de andrógenos como la testosterona, la dihidrotestosterona, la androstenediona y la deshidroepiandrosterona. Los andrógenos aumentan la masa muscular, estimulan el crecimiento celular y son responsables de la aparición de los caracteres sexuales secundarios masculinos (Ehrhart-Bornstein y col., 1998).

Los esteroides corticales actúan sobre las células adrenomedulares para controlar su diferenciación durante el desarrollo embrionario y regular la síntesis y liberación de catecolaminas (CAs) en el individuo adulto (Kawata y col., 1994). Así mismo, pueden modificar la actividad de los nAChRs, bien inhibiéndolos (Paradiso y col., 2000) o potenciándolos (Curtis y col., 2002), dependiendo de la especie animal estudiada.

1.4.1.2. La médula adrenal

Está constituida por las células cromafines que representan la principal fuente de CAs – adrenalina (A) y NA – del organismo. Las células cromafines deben el nombre a su afinidad por las sales de cromo que les confieren una coloración amarillo-parduzca al microscopio óptico. Derivan de la cresta neural y tanto anatómica como funcionalmente forman parte del sistema nervioso simpático, pudiendo considerarse neuronas ganglionares modificadas (Artalejo, 1995).

Las células cromafines sintetizan y almacenan en vesículas secretoras, denominadas gránulos cromafines, grandes cantidades de CAs que liberan al torrente sanguíneo en situaciones de estrés, como las que producen miedo o inducen a la lucha o a la huida (Aunis y Langley, 1999). Las CAs circulantes contribuyen a la respuesta general de adaptación del organismo al estrés, provocando taquicardia, vasoconstricción, broncodilatación y la movilización de las reservas energéticas (Carrasco y Van de Kar, 2003).

Las células cromafines presentan una apariencia poligonal en la glándula intacta pero adoptan la forma de una esfera de 10-15 μm de diámetro cuando se aíslan mediante digestión enzimática. Habitualmente, su núcleo se encuentra localizado excéntricamente, quedando ocupado el resto del citoplasma por 20000-30000 gránulos cromafines con diámetros entre 300 y 400 nm (Burgoyne, 1991; Burgoyne y col., 1993; Plattner y col., 1997) (**Figura 1.19**).



Figura 1.19. Representación esquemática de una célula cromafín innervada por la terminación nerviosa de una fibra del nervio esplácnico (de color amarillo). Pueden observarse el núcleo desplazado hacia uno de los extremos de la célula y diversas organelas (aparato de Golgi, retículo endoplásmico, mitocondrias y gránulos cromafines) distribuidas en el citoplasma. En el ángulo inferior izquierdo aparece un vaso sanguíneo en el que la célula cromafín vertería los productos de su secreción.

Desde comienzos de los años 50 diversas aproximaciones experimentales permitieron establecer la existencia, de al menos dos subtipos de células cromafines dependiendo de las CAs (A o NA) almacenada y segregada por cada uno de ellos. La primera evidencia de esta heterogeneidad celular fue obtenida en cortes de médula adrenal fijados con fomaldehído en los que se podían observar células *positivas* y *negativas* al teñirlas con soluciones de plata (Eranko, 1952). Posteriormente, gracias a la microscopía de fluorescencia, se identificó a las células noradrenérgicas como aquellas que presentaban una débil fluorescencia verde en soluciones de formalina (Eranko, 1955). La existencia de dos clases de células cromafines fue confirmada utilizando técnicas de microscopía electrónica en muestras fijadas con soluciones de glutaraldehído/dicromato potásico (Wood y Barnett, 1964) o de glutaraldehído/tetróxido de osmio (Coupland y col., 1964). En esos trabajos se evidenció que las células adrenérgicas poseen gránulos de forma redondeada y contenido más claro que los gránulos de las células noradrenérgicas, que presentan mayor densidad electrónica debido al precipitado que forma la NA al reaccionar con el glutaraldehído.

Posteriormente, diversos estudios inmunocitoquímicos han corroborado la existencia de dos poblaciones distintas de células cromafines basándose en la presencia o la ausencia de la enzima feniletanolamina N-metiltransferasa (PNMT) (Goldstein y col., 1971). Fenotípicamente, todas las células cromafines son positivas para la dopamina β -hidroxilasa (DBH), presente tanto como elemento estructural de la membrana vesicular y como componente soluble en el interior de la vesícula. Sin embargo, la PNMT, sólo se encontraría presente en el citosol de las células adrenérgicas.

Las diferencias entre los subtipos de células cromafines no quedan restringidas a las CAs almacenadas, habiéndose encontrado también respecto a la localización de algunos péptidos. Los

péptidos opiáceos Leu-enkefalina y Met-enkefalina (Livett y col., 1981) y la galanina (Rokaeus, 1987) se encuentran preferentemente en las células adrenérgicas, mientras que la dinorfina (Dumont y col., 1983) y la etorfina (Lemaire y col., 1983) lo hacen en las células noradrenérgicas. Más recientemente, resultados obtenidos en células individuales empleando técnicas amperométricas y microcromatográficas han complicado el panorama de la diversidad de tipos celulares cromafines. Así, se ha descrito un tercer subtipo celular caracterizado por almacenar y segregar cantidades similares de A y NA (Ciolkowsky y col., 1992; Cooper y col., 1994).

Las fibras nerviosas predominantes en la médula adrenal son las simpáticas preganglionares (amielínicas y colinérgicas). Estas fibras proceden de la médula espinal (niveles T3-L2 del asta intermedio lateral) y a través de los nervios espláncnicos mayor y menor acceden a la médula adrenal donde hacen sinapsis con las células cromafines. Se ha descrito la presencia de dos tipos de vesículas en las terminaciones de las fibras simpáticas preganglionares. Las más numerosas son de pequeño tamaño (10-60 nm de diámetro), claras y de naturaleza colinérgica, y coexistirían con una población minoritaria formada por vesículas de mayor diámetro (25-215 nm) de núcleo electrodensito y que presumiblemente almacenarían neuropéptidos (péptido intestinal vasoactivo (VIP), sustancia P (SP) y opioides) (Coupland, 1965; Tomlinson y Coupland, 1990). Las fibras preganglionares simpáticas son las principales responsables de la neurotransmisión en la unión esplacno-cromafín.

Durante la activación simpática, la ACh liberada por las terminaciones se combina con nAChRs y receptores muscarínicos (mAChRs) de la membrana de las células cromafines. Como consecuencia de la activación de los nAChRs se produce la despolarización celular y, eventualmente, la descarga de potenciales de acción con la consiguiente entrada de Ca^{2+} a través de canales Ca_v . Adicionalmente, neuropéptidos como el VIP o la SP procedentes de estas mismas fibras ejercerían un efecto modulador tanto de la neurotransmisión (a nivel de los nAChRs) como de la respuesta secretora de las células cromafines (regulación de los canales de Ca_v).

En el seno de la médula adrenal se han identificado neuronas ganglionares simpáticas y/o parasimpáticas encargadas de la regulación del flujo sanguíneo intramedular y con las que harían sinapsis tanto las fibras preganglionares de neuronas cuyos somas se localizan en la médula espinal y/o el núcleo motor del vago (Afework, 1988; Coupland y col., 1989; Parker y col., 1990).

La médula adrenal cuenta también con innervación sensitiva a cargo de fibras pertenecientes a neuronas con somas en los DRGs (T9 y T10) y en el núcleo nodoso del vago (Parker y col., 1993). Se trata de fibras sensibles a capsaicina que almacenan SP, VIP y el péptido hipofisario activador de la adenilato ciclasa (PACAP). Además de transmitir información nociceptiva al SNC, estas fibras pueden actuar como mediadoras de efectos locales como la secreción de CAs o la vasodilatación.

La facilidad de cultivo –a partir de la glándula adrenal de mamíferos como la vaca, el gato, la rata, el perro, el cobaya, etc.– y la utilización de técnicas amperométricas (Chow y col., 1992; Albillos y col., 1997) y de medida de la capacitancia celular (Neher y Marty, 1982) para el estudio

de la exocitosis, han convertido a las células cromafines en un modelo ampliamente utilizado en estudios sobre la neurosecreción. Además, la posibilidad de realizar registros electrofisiológicos en rodajas de tejido adrenomedular permite el análisis de la sinapsis esplacno-adrenal y la utilización de esta preparación también como modelo en estudios sobre la neurotransmisión (Holman y col., 1994; Kajiwara y col., 1997; Martin y col., 2001).

1.4.1.3. Biosíntesis de las catecolaminas

Las CAs son sintetizadas a partir del aminoácido L-tirosina procedente de la dieta o de la hidroxilación de otro aminoácido, la fenilalanina. La primera etapa en la ruta biosintética consiste en la conversión de la tirosina en dihidroxifenilalanina (DOPA), con el concurso de la tirosina hidroxilasa (TH), una enzima citosólica (Kaufman, 1995; Flatmark, 2000). Existen múltiples mecanismos de regulación de la actividad de la TH actuando en distintas escalas de tiempo. La actividad de esta enzima está *instantáneamente* –segundos-minutos– regulada por la disponibilidad de tetrahidrobiopterina, que actúa como cofactor en la reacción de hidroxilación, y de los distintos productos de la ruta biosintética (DOPA, NA y A), que mediante la inhibición de la enzima operan como sistema de retroalimentación negativa. También en la escala de los minutos se establece la regulación de la TH por diversas cinasas (proteína cinasa A (PKA), proteína cinasa C (PKC), proteína cinasa G (PKG), proteína cinasas reguladas extracelularmente 1 y 2 (ERK 1/2) y proteína cinasa dependiente de Ca^{2+} /calmodulina (CaMKII) capaces de modular alostéricamente su actividad mediante la fosforilación de diversas serinas situadas en el extremo N-terminal (Nagatsu, 1995; Kumer y Vrana, 1996; Dunkley y col., 2004). En una escala de tiempo mayor –horas– la actividad de la enzima se regula a nivel transcripcional, lo cual incluye cambios en la velocidad de síntesis del ARNm de diversas isoformas generadas por ajuste alternativo. De hecho, la modificación de la expresión del gen de la TH constituye un mecanismo fundamental de la respuesta del sistema catecolaminérgico al estrés. La L-DOPA se convierte en dopamina (DA) con el concurso de la L-aminoácido-aromático descarboxilasa (LAAD), una enzima con escasa especificidad de sustrato cuya actividad se regula por la disponibilidad de su cofactor, el piridoxal fosfato. La DA se incorpora desde el citosol al interior de vesículas de secreción en las que es convertida en NA por la DBH, una enzima que se encuentra tanto en la membrana como en la fracción soluble de las vesículas. La fracción soluble es liberada durante la exocitosis, lo que explica la detección de esta enzima en el plasma y en el líquido cefalorraquídeo (Weinshilboum y Axelrod, 1971). Finalmente, la NA es transformada en A por la enzima citosólica PNMT. Esta enzima se localiza predominantemente en la médula adrenal, en algunos órganos y tejidos no neuronales inervados por el sistema nervioso simpático (corazón, piel, músculo esquelético, etc.) (Kvetnansky y col., 1971; Kennedy y col., 1993; Huang y col., 1996; Ziegler y col., 1998; Huang y col., 2005; Pullar y col., 2006) así como en algunas

regiones cerebrales (Vogel y col., 1976; Lew y col., 1977; Kopp y col., 1979; Fuller, 1982; Mefford, 1988), estando su expresión regulada por GC (Figura 1.20).

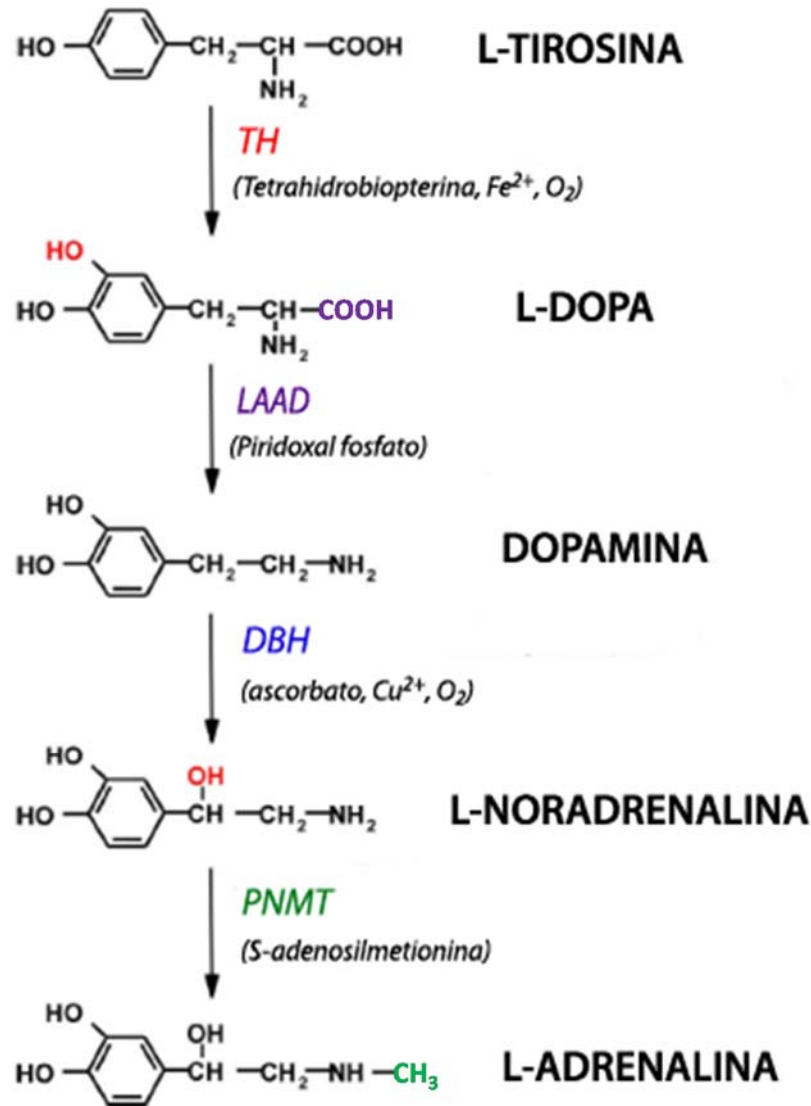


Figura 1.20. Ruta biosintética de las CAs. Los pasos de la conversión de L-tirosina a L-noradrenalina son típicos del sistema simpático y algunas neuronas cerebrales, mientras que la conversión de L-noradrenalina en L-adrenalina es típica de las células de la médula adrenal y algunas neuronas periféricas y cerebrales. En rojo se muestran los grupos químicos modificados en las distintas reacciones enzimáticas. Los cofactores implicados en cada etapa de la ruta biosintética aparecen entre paréntesis debajo del nombre de la enzima correspondiente (Tomada de (Kvetnansky y col., 2009).

1.4.2. Propiedades eléctricas y canales iónicos de las células cromafines

1.4.2.1. Propiedades eléctricas pasivas de la membrana celular

Fenwick (Fenwick y col., 1982b) realizó una descripción, que hoy podemos considerar clásica, de las propiedades pasivas de la membrana de las células cromafines bovinas mediante la

técnica de *patch-clamp*. En células cromafines aisladas estimaron que la resistencia de entrada era de al menos 5 G Ω y la constante de tiempo de la membrana, calculada a partir de la respuesta de voltaje inducida por pulsos de corriente, de ≈ 50 ms; esta constante de tiempo está relacionada con una capacitancia de la membrana celular comprendida entre 4 y 10 pF. Considerando que las células cromafines tienen forma esférica y diámetros entre 10 y 15 μm , el cociente entre la superficie de la célula y su capacitancia permite estimar una capacitancia específica de la membrana de 1,08 $\mu\text{F}/\text{cm}^2$.

La resistencia de entrada de la membrana así como la constante de tiempo medidas con la técnica de *patch-clamp* presentan valores superiores a los estimados mediante el empleo de microelectrodos intracelulares en cortes de la glándula adrenal de distintas especies (ratón, cobaya) (Nassar-Gentina y col., 1988; Holman y col., 1994). Estas diferencias pueden ser atribuidas al daño causado por los electrodos en la membrana y que originaría una corriente de fuga con la consiguiente disminución en la resistencia de la membrana así como a la existencia de acoplamiento eléctrico entre las células cromafines *in situ* (Nassar-Gentina y col., 1988; Moser, 1998; Martin y col., 2001).

1.4.2.2. El potencial de membrana en reposo y relación corriente-voltaje

El potencial de membrana en reposo (V_r) de las células cromafines se sitúa entre -50 y -80 mV (Artalejo, 1995). En el establecimiento del potencial de la célula en condiciones de “reposo (V_r)” de las células cromafines parece clara la contribución de las conductancias de la membrana al K^+ , dado que el V_r varía linealmente con el logaritmo de la concentración extracelular de K^+ y que la ecuación de Goldman-Hodgkin-Katz establece una relación de permeabilidades para el Na^+ y K^+ de 0,07 (Douglas y col., 1967). Otra evidencia que implica a los canales de K^+ en el control del V_r estriba en el efecto despolarizante del Ba^{2+} (1 mM) y del tetrametilamonio (30 mM), dos bloqueantes no selectivos de este tipo de canales (Marty y Neher, 1985; Nassar-Gentina y col., 1988; González-García y col., 1993; von Ruden y col., 1993).

La identidad de los canales iónicos involucrados en el control del V_r permanece aún relativamente desconocida, aunque existen datos que apuntan a los canales de K^+ rectificadores de entrada (Akaike y col., 1990a; Akaike y col., 1990b; Inoue y Imanaga, 1993), a los canales de K^+ tipo ERG (Chiesa y col., 1997), los canales de K^+ responsables de la corriente de tipo M (Wallace y col., 2002) y a los canales de K^+ tipo TASK (Inoue y col., 2012).

Por último, cabe mencionar que los canales SK, los canales catiónicos dependientes de Ca^{2+} y los canales de Ca_v de los tipos T y L podrían también regular la excitabilidad celular en situaciones en las que la célula se encuentre ligeramente despolarizada o la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se halle mínimamente elevada (200-300 nM) (Fenwick y col., 1982a; Neely y Lingle, 1992; Artalejo y col., 1993; Marcantoni y col., 2007).

1.4.2.3. El potencial de acción

Las células cromafines de rata descargan espontáneamente potenciales de acción (Brandt y col., 1976; Akaike y col., 1990a; Hollins y Ikeda, 1996). El potencial de acción de las células cromafines muestra algunas características similares a las de los potenciales de acción de los axones, que son generados por la apertura de canales de Na^+ dependientes de voltaje (Na_v). Así, presentan una fase de rápida despolarización (pendiente máxima de 50 V/s), alcanzan valores de potencial muy despolarizados ($\geq +30$ mV) y muestran pronunciadas posthiperpolarizaciones (AHPs) (Ishikawa y Kanno, 1978; Fenwick y col., 1982a; Hollins y Ikeda, 1996). Sin embargo, la eliminación del Na^+ del medio extracelular y la adición de tetrodotoxina, un bloqueante de canales de Na^+ neuronales, no impide la generación de potenciales de acción por las células cromafines, siendo necesario eliminar tanto el Na^+ como el Ca^{2+} del medio extracelular para anular la probabilidad de disparo (Kidokoro y Ritchie, 1980; Nassar-Gentina y col., 1988).

Otra característica de los potenciales de acción de las células cromafines es la existencia de periodos refractarios relativamente largos (Iijima y col., 1992). Tal como se ha comprobado mediante sondas potenciométricas, dichos periodos pueden llegar a alcanzar los 10 ms, siendo considerablemente más duraderos que los observados en el nervio esplácnico.

1.4.2.4. Canales iónicos activados durante el potencial de acción

1.4.2.4.1. Canales de Na^+

Las conductancias de Na^+ dependientes de voltaje de las células cromafines son debidas a canales similares a los descritos por Hodgkin y Huxley en el axón gigante del calamar (Hodgkin y Huxley, 1952; Hodgkin y col., 1952). Mediante la utilización de registros de canal único y de corrientes globales, Fenwick y col. (1982b) realizaron la primera descripción de los canales Na_v de las células cromafines bovinas. La corriente macroscópica de Na^+ comienza a activarse alrededor de -30 mV y alcanza la máxima amplitud a +10 mV. El potencial de semi-inactivación en estado estacionario de los canales de Na^+ es de -35 mV. Los registros de canal único en parches de membrana en la configuración exterior hacia afuera revelaron una corriente elemental de 1 pA a -10 mV (150 mM de Na^+ extracelular y 10 mM de Na^+ intracelular) que se incrementa con la hiperpolarización entre -10 y -40 mV. El tiempo medio de apertura de los canales de Na^+ es de 1 ms a -30 mV y disminuye tanto con la despolarización como con la hiperpolarización de la membrana. En conjunto, el análisis del ruido de las fluctuaciones debidas a las aperturas y cierres estocásticos de los canales de Na^+ ofrece valores consistentes con las mediciones de las corrientes unitarias, lo que sugiere la existencia de un solo tipo de canal Na_v en las células cromafines. El cociente entre la amplitud máxima de la corriente macroscópica (rango de 150 a 1.000 pA) y la corriente unitaria,

permite estimar una densidad de canales Na_v en la membrana de las células cromafines de 1,5 a 10 canales por μm^2 .

Entre los canales Na_v presentes en las células cromafines de la médula adrenal de la rata, cabe destacar una isoforma en particular, la $\text{Na}_v 1.7$ (Klugbauer y col., 1995; Catterall y col., 2002; Catterall y col., 2005), la cual, a su vez, se localiza en los ganglios autónomos periféricos (Toledo-Aral y col., 1997). La corriente generada a través de la isoforma $\text{Na}_v 1.7$ se caracteriza por una activación que se inicia alrededor de -40 mV hasta alcanzar su máxima amplitud a +20 mV, con un potencial de activación 50% (V_{50}) de -7,6 mV (Wada y col., 2008). Entre las propiedades biofísicas de la isoforma $\text{Na}_v 1.7$ destacan una constante de tiempo de inactivación de 155 ms, que permite la generación de potenciales de acción durante despolarizaciones lentas y de larga duración, así como, una constante de tiempo de recuperación desde el estado de inactivación (τ_{rec}) de 72 ms (Herzog y col., 2003; Vandael y col., 2015), que condiciona la descarga de potenciales de acción a baja frecuencia, característica típica de las células cromafines.

1.4.2.4.2. Canales de Ca^{2+}

Los canales Ca_v comprenden varios tipos biofísica y farmacológicamente distintos (García y col., 2006). La corriente macroscópica de Ca^{2+} se activa a potenciales positivos a -30 mV, alcanza un pico alrededor de +10 mV y revierte a partir de +60 mV (Fenwick y col., 1982b). Resultados recientes atribuyen a los canales de Ca^{2+} de tipo L formados por la subunidad α_{1D} un papel relevante en el control de la frecuencia de disparo (función de marcapasos) de los potenciales de acción en las células cromafines (Marcantoni y col., 2007). La densidad de estos canales es parecida a la de los canales Na_v . Se ha detectado la presencia, aunque a niveles bajos, de canales de Ca^{2+} de tipo T en células cromafines de rata (Hollins y Ikeda, 1996; Novara y col., 2004; Carabelli y col., 2007a), los cuales actuarían disminuyendo el umbral de generación de los potenciales de acción. Estos canales alcanzan relevancia en situaciones de estrés, en donde las células cromafines se encuentran despolarizadas durante largos periodos de tiempo o disparan potenciales de acción a altas frecuencias (15-20 Hz).

1.4.2.4.3. Canales de K^+

Los canales Na_v y los Ca_v son los responsables de la fase de despolarización del potencial de acción, mientras que la repolarización es llevada a cabo por canales de K^+ , tanto rectificadores retrasados como dependientes de Ca^{2+} (Marty y Neher, 1985; Sala y Soria, 1991). No obstante, mediante la aplicación de pulsos de voltaje con forma de potencial de acción, Pancrazio y col. (1994) determinaron que los canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} y elevada conductancia iónica (canales BK)

darían cuenta del 75% de la corriente de salida de K^+ durante la fase de repolarización de los potenciales de acción de las células cromafines bovinas.

1.4.2.5. Canales de K^+ de las células cromafines

Los canales de K^+ descritos en las células cromafines se pueden clasificar en función de la dependencia de voltaje y de Ca^{2+} de su activación, y de su tipo de su rectificación. Así pues, existen canales de K^+ dependientes de voltaje (K_v), dependientes de Ca^{2+} , dependientes de Ca^{2+} y voltaje y, por último, canales rectificadores de entrada. A continuación hacemos un rápido recorrido por todos ellos en las diferentes especies de mamíferos en las que se han estudiado.

1.4.2.5.1. Canales de K^+ dependientes de voltaje

En un detallado estudio llevado a cabo en células cromafines bovinas, Marty y Neher (1985) describieron dos tipos de canales K_v , que denominaron FK y SK (*fast-K* y *slow-K*) debido a que el primero presentaba cinéticas de activación e inactivación más rápidas que el segundo. En registros de canal único, el canal FK presenta una conductancia unitaria de 18 pS (140 mM KCl intracelular y 140 mM NaCl extracelular), actividad en forma de ráfagas y probabilidad de apertura que es máxima entre +20 y +40 mV. El canal FK se inactiva de forma dependiente de voltaje con una constante de tiempo del orden de las decenas de ms. El canal SK también presenta actividad en ráfagas y posee una conductancia unitaria de 8 pS en las condiciones iónicas referidas para el canal FK. No debe confundirse este canal SK con el canal de K^+ dependiente de Ca^{2+} de pequeña conductancia, también llamado SK, por *small-K*.

García-Guzmán y col. (1992) clonaron un canal de K^+ de inactivación rápida procedente de la médula adrenal bovina y que fue expresado en células de neuroblastoma. Si bien este canal genera una corriente macroscópica de K^+ con una constante de tiempo de inactivación en torno a los 40 ms independientemente del potencial de membrana, difiere del canal FK por su resistencia al tetraetilamonio (40 mM).

También en células cromafines bovinas, Sala y col. (1991) aislaron una corriente de K^+ con rectificación de salida al despolarizar desde -60 mV en presencia de 0,5 mM de $CdCl_2$ extracelular y altas concentraciones citosólicas (11 mM) de EGTA para evitar la activación de canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} . Esta corriente se activa lentamente (el canal responsable sería un rectificador retrasado) y experimenta una inactivación muy lenta y dependiente de voltaje (V_{50} de -40 mV). Dado que la inactivación en el estado estacionario de esta corriente aumentaba al incrementar la frecuencia o la duración de los pulsos despolarizantes, propusieron que los canales de K^+ responsables de esta

corriente podrían contribuir al ensanchamiento de los potenciales de acción y, por tanto, al incremento de la entrada de Ca^{2+} durante estimulaciones repetitivas.

Wallace (Wallace y col., 2002) describió la existencia de canales de K^+ rectificadores de salida responsables de la generación de corrientes de tipo M en las células cromafines bovinas. Las corrientes de K^+ de tipo M son dependientes de voltaje (se activan al despolarizar con V_{50} de ~ -40 mV), no inactivantes y de muy lenta deactivación. Característicamente, los canales de tipo M están activados al V_r de la membrana (≈ -50 mV) y contribuyen al mismo. Distintos neurotransmisores (ACh) y neuromoduladores inhiben los canales de tipo M ocasionando la despolarización celular y eventualmente el disparo de potenciales de acción. Los canales de tipo M se bloquean también por Ca^{2+} y Cs^+ intracelular. Otro canal de K^+ rectificador de salida es el TAK1 (*TWIK-related acid-sensitive K^+*), descrito en las células cromafines de rata y cobaya (Inoue y col., 2012). Este canal se bloquea por la acidificación del medio extracelular y la estimulación de los mAChRs.

Entre los canales de K^+ con rectificación de entrada (Akaike y col., 1990b), el de tipo ERG ha sido el mejor caracterizado. Los canales ERG están abiertos al potencial de reposo y se inactivan con la despolarización. Además, su activación es lenta y progresa a lo largo de los trenes de potenciales de acción contribuyendo, por tanto, al proceso de acomodación de la frecuencia de disparo durante dichos trenes. Existen evidencias funcionales, inmunocitoquímicas y de biología molecular a favor de la expresión de estos canales en las células cromafines de rata de tipo adrenérgico (inmunoreactividad positiva para PNMT) (Gullo y col., 2003). La densidad de la corriente generada por este canal es muy variable en las distintas células cromafines (rango desde 0 hasta 90 pA/pF). La administración de WAY-123,398 (1-2 μM), un bloqueante selectivo de los canales ERG, induce la despolarización de la célula cromafín con aumento inicial de la frecuencia de descarga de potenciales de acción seguida de la disminución de la amplitud (juntamente con la reducción de la AHP) y el aumento de la duración de los mismos, hasta su desaparición.

1.4.2.5.2. Canales de K^+ dependientes de Ca^{2+}

Comprenden dos tipos de canales diferenciables por su conductancia iónica y mecanismo de activación: los canales SK y los canales BK.

Los canales SK constituyen la única familia (SK1 al SK4) de canales selectivos para K^+ que se activan por el incremento del Ca^{2+} intracelular (Maylie y col., 2004). Los canales SK de las células cromafines poseen una conductancia unitaria de 3-5 pS (a concentraciones de K^+ fisiológicas), presentan una mínima sensibilidad a los cambios de voltaje y son bloqueados por apamina y d-tubocurarina. Dada su sensibilidad al Ca^{2+} y su independencia del voltaje, los canales SK juegan un papel importante cuando se eleva la concentración citosólica de Ca^{2+} de las células cromafines en ausencia de despolarización o cuando ésta es de unos pocos mV (p. ej., durante los *excitatory*

postsynaptic potentials, EPSPs). La primera circunstancia se produce tras la administración de sustancias que incrementan la síntesis de inositol trifosfato (IP₃), como la muscarina (en la rata), la metacolina (en el gato) y la histamina (en la vaca) (Horn y Marty, 1988; Eberhard y Holz, 1991; Neely y Lingle, 1992; Uceda y col., 1992; Artalejo y col., 1993). La consecuencia inmediata de la activación de los canales SK es una hiperpolarización transitoria, la reducción de la duración de los EPSPs y una disminución en la frecuencia de disparo de potenciales de acción inducida por la inyección de corriente (acomodación).

Las células cromafines de todas las especies investigadas presentan canales de K⁺ dependientes de Ca²⁺ de elevada conductancia iónica (canales BK) sensibles a caribdotoxina, iberiotoxina y paxilina (Scott y col., 2011). La presencia de estos canales se pone claramente de manifiesto en las curvas I/V realizadas en presencia de Ca²⁺ extracelular. Los pulsos rectangulares de voltaje producen corrientes de salida de K⁺ que resultan mucho más prominentes con despolarizaciones en el rango entre -20 y +20 mV (curva I/V con forma de “N”). Ello se debe a que, a esos potenciales, la entrada de Ca²⁺ a través de los canales Ca_v es más intensa y, en consecuencia, mayor la activación de los canales BK (Marty y Neher, 1985).

Los canales BK de las células cromafines bovinas y de la rata tienen una conductancia en K⁺ isométrico (140 mM) de 180 y 275 pS, respectivamente (Marty, 1981; Solaro y Lingle, 1992). En presencia de concentraciones de K⁺ fisiológicas (140 mM KCl en el interior y 2,8 mM KCl en el exterior) los valores de esas conductancias pasan a ser de 96 y 210 pS (Marty, 1981; Marty y Neher, 1985; Glavinovic y Trifaro, 1988). En presencia de concentraciones de Ca²⁺ intracelular inferiores a 1 μM, estos canales manifiestan dependencia del voltaje de forma que su probabilidad de apertura aumenta con la despolarización (Scott y col., 2011).

Las corrientes BK de las células cromafines de rata presentan una pronunciada inactivación dependiente de Ca²⁺ y voltaje, de manera que una gran mayoría (80%) de los parches de membrana en la configuración interior hacia afuera muestran corrientes BK totalmente inactivantes en menos de 300 ms (4 μM de Ca²⁺ intracelular) (Neely y Lingle, 1992; Lovell y col., 2000).

1.4.2.6. Los nAChRs de las células cromafines de la médula adrenal

Los nAChRs neuronales se expresan tanto en el SNC como en tejidos periféricos, entre los que se incluye la médula adrenal; a pesar de los numerosos estudios realizados empleando muy diversas aproximaciones experimentales (inmunocitoquímica e hibridación *in situ*, fijación de radioligandos, reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR), expresión heteróloga de subunidades obtenidas de librerías de la médula adrenal y estudios funcionales) no se conoce con exactitud la composición de subunidades de los nAChRs presentes en las células cromafines de la médula adrenal de las diferentes especies de mamíferos de interés en biomedicina

(rata, hombre, ratón, vaca, perro, gato y cerdo) (Sala y col., 2008). No obstante, existen evidencias de que en las células cromafines de la rata y del hombre podrían expresarse nAChRs formados por las subunidades $\alpha 2$ (no en el hombre), $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\alpha 7$, $\alpha 9$, $\alpha 10$, $\beta 2$, $\beta 3$ y $\beta 4$ (Mousavi y col., 2001; Di Angelantonio y col., 2003; Olivos Ore y Artalejo, 2004; Colomer y col., 2010; Pérez-Álvarez y col., 2012a; Pérez-Álvarez y col., 2012b), mientras que en la vaca las subunidades constituyentes de los nAChRs serían la $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 7$ y $\beta 4$ (Wilson y Kirshner, 1977; Criado y col., 1992; García-Guzmán y col., 1995; Gu y col., 1996; Campos-Caro y col., 1997; Free y col., 2002). En esta última especie, es de destacar también que la subunidad $\alpha 7$ se expresaría exclusivamente en las células adrenérgicas bajo la influencia de los corticoides de la corteza suprarrenal que, vía el factor de transcripción Egr-1 (*early growth response protein-1*), activan coordinadamente la transcripción de los genes que codifican la PNMT y la subunidad $\alpha 7$ de los nAChRs (Criado y col., 1997; Carrasco-Serrano y Criado, 2004). Finalmente, y mediante la utilización de la técnica RT-PCR, Wu y col (2010) han determinado que las células cromafines de ratón transcriben ARNm de las subunidades $\alpha 1$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 7$, $\alpha 9$, $\beta 1$, $\beta 2$ y $\beta 3$.

A partir del empleo de distintas herramientas farmacológicas (DMPP, epibatidina, Cho, hexametonio, mecamilamina, PNU-282987, PNU-120596, 5-hidroxiindol, MLA, α -BgTx, κ -bungarotoxina, α -ImI, α -AuIB, α -conotoxina BuIA, α -MII y α -conotoxina MII[54A, E11A, L15A] y α -RgIA) en estudios de índole funcional (electrofisiológicos y de medida de la respuesta secretora), en la actualidad se considera que el nAChR mayoritario de las células cromafines de rata y ratón es el de tipo ganglionar, formado por las subunidades $\alpha 3$ y $\beta 4$, a las que también podrían asociarse, para constituir heterómeros más complejos, las subunidades $\alpha 5$, $\alpha 6$ y/o $\beta 2$. Este nAChR sería el responsable principal de los cambios observados en el potencial de membrana y, consiguientemente, en la respuesta secretora inducida por la ACh en las células cromafines (Nooney y col., 1992; Barbara y Takeda, 1996; Kajiwara y col., 1997; Wenger y col., 1997; Tachikawa y col., 2001; Yokotani y col., 2002; Di Angelantonio y col., 2003; Martin y col., 2003; Free y col., 2005; Pérez-Álvarez y col., 2012a; Pérez-Álvarez y col., 2012b). Si embargo, en las células cromafines humanas y de mono (*Macaca mulatta*), el nAChR predominante sería el $\alpha 6\beta 4^*$ (Pérez-Álvarez y col., 2012b; Hernandez-Vivanco y col., 2014). Así mismo, cabe pensar en la existencia con carácter minoritario de nAChRs parcial o totalmente formados por las subunidades $\alpha 7$, $\alpha 9$ y $\alpha 10$, que también podrían contribuir a la respuesta secretora de CAs (López y col., 1998; Maneu y col., 2002; Martin y col., 2003; Colomer y col., 2010).

Los nAChRs de las células cromafines presentan una conductancia unitaria a potenciales de membrana negativos (desde -40 hasta -120 mV) comprendida entre los 30 pS (en el caso de las células del cobaya y de la rata; (Kidokoro, 1983; Inoue y Kuriyama, 1991) y los 50 pS (en las células cromafines de la vaca; (Fenwick y col., 1982b; Cull-Candy y col., 1988; Maconochie y Knight, 1992), dependiendo de la especie animal y de las soluciones de registro utilizadas, y exhiben tiempos

medios de apertura prolongados (15-30 ms); (Fenwick y col., 1982b; Kidokoro, 1983; Inoue y Kuriyama, 1991).

La relación I/V de los nAChRs muestra rectificación de entrada, y un comportamiento bifásico a potenciales positivos al de reversión (E_{rev}), con una región de casi nula conductancia entre 0 y +40 mV seguida de una región con corrientes de salida crecientes a potenciales superiores. El E_{rev} de la corriente nicotínica es aproximadamente de 0 mV, lo que indica que los nAChRs de las células cromafines se comportan como canales no selectivos para cationes. La selectividad iónica de los nAChRs de la célula cromafín bovina y de rata se ha estudiado mediante la medida del E_{rev} de la corriente nicotínica en presencia de distintas soluciones iónicas, encontrándose que la permeabilidad relativa al Na^+ de cationes monovalentes como el Cs^+ , el Li^+ y el $Tris^+$ es similar a la encontrada en los nAChRs de tipo muscular (ver **Tabla 1.1**) (Nooney y col., 1992). Sin embargo, la permeabilidad al Ca^{2+} de los nAChRs de las células cromafines es notablemente superior a la que presentan los nAChRs de la unión neuromuscular. La capacidad del Ca^{2+} para permear los nAChRs de las células cromafines fue inicialmente propuesta por Douglas (Douglas y col., 1967) al estudiar los mecanismos iónicos de la despolarización inducida por ACh y observar que la retirada del Na^+ del medio extracelular no abolía la respuesta de potencial y que la amplitud del componente residual cambiaba al modificar la concentración extracelular de Ca^{2+} . El Ca^{2+} en condiciones iónicas fisiológicas presenta una permeabilidad significativa a través de los nAChRs de las células cromafines bovinas (P_{Ca}/P_{Na} de 1,53; (Nooney y col., 1992) y de la rata (P_{Ca}/P_{Na} de 3,32) (Olivos-Oré, 2009). Estos resultados fueron confirmados por Zhou y Neher (Zhou y Neher, 1993b) mediante la medida directa de la entrada de Ca^{2+} empleando de forma combinada la microfluorometría de la sonda de Ca^{2+} fura-2 y la técnica de *patch-clamp*. Estos autores estimaron que, en presencia de 2 mM de Ca^{2+} en el medio extracelular y al potencial de membrana de -70 mV, la entrada fraccional de Ca^{2+} a través de los nAChRs es del 2,5%. Considerando que las corrientes nicotínicas pueden alcanzar en las células cromafines amplitudes superiores a 1 nA, la entrada de Ca^{2+} a través de los nAChRs podría originar elevaciones de la concentración intracelular de Ca^{2+} en el rango μM cuando el potencial de membrana se mantiene polarizado. Además, en esas condiciones experimentales, la entrada de Ca^{2+} a través de los nAChRs es capaz de inducir una respuesta secretora (Mollard y col., 1995). Por otro lado, el Ca^{2+} actuando extracelularmente, también puede modular la actividad de los nAChRs de las células cromafines. La supresión del Ca^{2+} en la solución externa produce una notable reducción de las corrientes nicotínicas, mientras que éstas se potencian cuando la concentración extracelular de Ca^{2+} se eleva por encima de 1 mM (Vernino y col., 1992; Zhou y Neher, 1993a) (Olivos, 2009).

1.4.2.7. Los nAChRs y el potencial de membrana de la célula cromafín

La activación de los nAChRs induce cambios en el potencial de membrana así como modificaciones –tanto de forma directa como indirecta– en la concentración de Ca^{2+} intracelular. Si bien los primeros suelen ser de breve duración, los segundos pueden dar lugar a respuestas relativamente prolongadas en el tiempo (Dajas-Bailador y Wonnacott, 2004).

La ACh liberada por las terminaciones del nervio esplácnico activa nAChRs y mAChRs de la membrana de las células cromafines. Clásicamente, se viene aceptando que la ACh origina una respuesta despolarizante rápida dependiente de la activación de los nAChRs, con el consiguiente disparo de potenciales de acción, seguida de una fase de hiperpolarización relacionada con el aumento de la conductancia de K^+ activada por el incremento del Ca^{2+} citosólico y dependiente tanto de la movilización de los depósitos intracelulares de este catión por la estimulación muscarínica como de su entrada a través de canales Ca_v activados durante la fase de despolarización (Olivos y Artalejo, 2008). El hallazgo en las células cromafines de nAChRs con alta permeabilidad al Ca^{2+} formados por las subunidades $\alpha 7$, $\alpha 9$ y $\alpha 10$; (Fuentelba y col., 2004; Fucile y col., 2006) ha añadido complejidad al mecanismo de señalización nicotínica al posibilitar un efecto dual, despolarizante e hiperpolarizante. La activación de los nAChRs induce un aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en la que participan distintos mecanismos: i) entrada de Ca^{2+} a través del nAChR, ii) entrada de Ca^{2+} a través de canales Ca_v activados por la despolarización y, iii) movilización de Ca^{2+} desde depósitos intracelulares. Dada la rectificación de entrada de la corriente nicotínica, el primero de los mecanismos operaría fundamentalmente al potencial de reposo mientras que el segundo sería predominante a potenciales positivos a -40 mV. La contribución relativa de estos mecanismos varía con el tipo de nAChR. Así para el nAChR de tipo ganglionar ($\alpha 3\beta 4$) el aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ es dependiente fundamentalmente de la despolarización y la entrada de Ca^{2+} a través de canales Ca_v ; sin embargo, los nAChRs de tipo $\alpha 7$, $\alpha 9$ y $\alpha 9\alpha 10$ posibilitarían la entrada de Ca^{2+} directamente a su través –independientemente de la activación de los canales Ca_v – la cual además, puede activar la liberación de Ca^{2+} desde depósitos intracelulares tanto sensibles a rianodina –mecanismo de tipo CICR– como sensibles a IP_3 (Eberhard y Holz, 1987; Eberhard y Holz, 1991; Dajas-Bailador y Wonnacott, 2004; Wu y col., 2010).

Por otra parte, la activación de un solo nAChRs puede ser suficiente para desencadenar un potencial de acción en las células cromafines bovinas (Fenwick y col., 1982b). La existencia de rectificación de entrada de los nAChRs neuronales permitiría que el potencial de acción alcanzara su máxima amplitud ya que, de no existir, la corriente nicotínica de salida cortocircuitaría el potencial de acción durante su fase despolarizante. De forma similar, la rectificación interna limitaría la entrada de Ca^{2+} durante la despolarización, previniendo la excitotoxicidad.

1.4.3. Acoplamiento excitación-secreción en las células cromafines

Hace ya más de 40 años que Douglas y Rubin (Douglas y Rubin, 1961a; Douglas y Rubin, 1961b) destacaron la importancia de la entrada de Ca^{2+} desde el exterior celular en el acoplamiento excitación-secreción de CAs de las células cromafines de la médula adrenal. Fisiológicamente, este proceso comienza con la unión de la ACh al nAChR y la consiguiente apertura del canal iónico asociado por el que, siguiendo su gradiente electroquímico, accederán al interior celular principalmente iones Na^+ y, en menor medida, Ca^{2+} (Douglas, 1968). La entrada de Na^+ induce una despolarización de la membrana (EPSP) suficiente para abrir canales Na_v (Cena y col., 1983), cuya activación regenerativa conduce al desencadenamiento de un potencial de acción. Durante el mismo se va a producir también la apertura de los canales Ca_v y, en consecuencia, la entrada de Ca^{2+} desde el espacio extracelular y la exocitosis de las CAs (Cena y col., 1983).

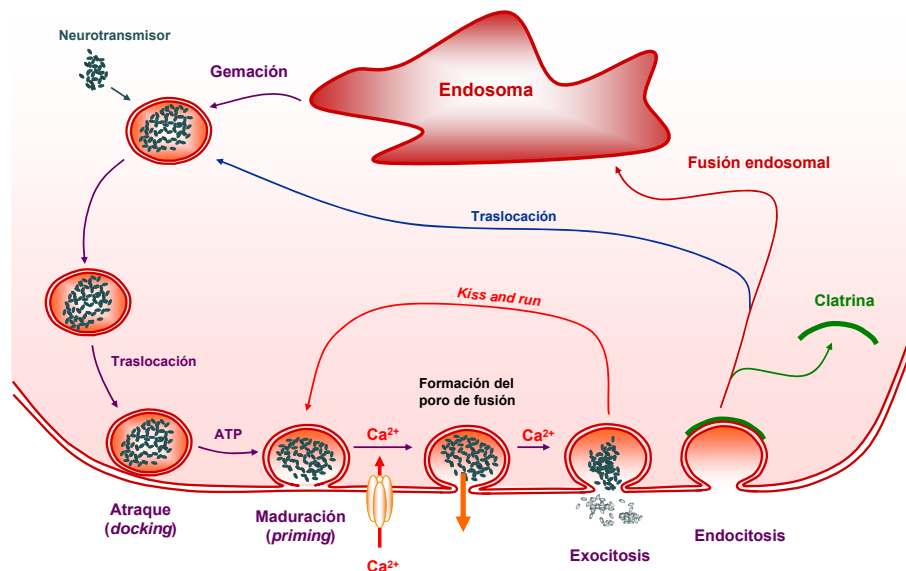


Figura 1.21. Etapas del ciclo de las vesículas secretoras inmediatamente anteriores y posteriores a la exocitosis. El ciclo vital de las vesículas no finaliza con la exocitosis sino que las vesículas pueden ser reutilizadas intracelularmente volviendo a ser exocitadas (exocitosis del tipo *kiss and run*) o recicladas (exocitosis completa) una vez que la membrana vesicular es internalizada mediante un proceso de endocitosis. Dentro de la célula la vesícula endocítica se fusiona con un endosoma temprano desde el que se formarán nuevas vesículas que se cargan con el neurotransmisor y son subsiguientemente translocadas a la membrana celular. Algunas de estas vesículas así como otras procedentes del aparato de Golgi entran en contacto (*docking*) con la membrana plasmática, si bien sólo una fracción de ellas experimenta un proceso de maduración (*priming*) que las faculta para ser liberadas mediante exocitosis. En el caso de la exocitosis regulada de las células excitables, la elevación de la concentración citosólica de Ca^{2+} , habitualmente como consecuencia de su entrada a través de canales Ca_v , es la señal que pone en marcha el proceso de fusión de membranas. El proceso de maduración vesicular y la endocitosis también son regulados por los niveles intracelulares de Ca^{2+} .

La exocitosis implica la fusión de la membrana de la vesícula con la membrana plasmática y el establecimiento de una solución de continuidad entre el interior vesicular y el espacio intersticial (Parsons y col., 1995). Dado que en el interior de las vesículas se almacenan los

mensajeros químicos a elevadas concentraciones, la exocitosis permite la liberación sincronizada de una gran cantidad de moléculas de los mismos.

La exocitosis constituye un caso particular de lo que se conoce como tráfico de membranas de las células eucarióticas, que conlleva la formación, el transporte y la utilización –para almacenar y liberar el mensajero químico– de vesículas membranosas. Además, existe una amplia evidencia bioquímica y morfológica de que con la exocitosis no finaliza el ciclo vital de las vesículas secretoras sino que éstas son recicladas intracelularmente una vez que su membrana es internalizada mediante un proceso denominado endocitosis (**Figura 1.21**).

1.5. TRANSMISIÓN SINÁPTICA EN LOS GANGLIOS AUTÓNOMOS Y EN LA MÉDULA ADRENAL

1.5.1. La transmisión ganglionar

Los ganglios autónomos funcionan como pequeños circuitos neuronales capaces de integrar aferencias diversas generando respuestas de naturaleza diferente (inhibidoras o excitadoras) con duraciones y amplitudes variadas. Estas aferencias pueden provenir de fibras preganglionares, interneuronas y fibras sensitivas procedentes de los órganos diana. Las fibras preganglionares liberan ACh como neurotransmisor principal, mientras que las fibras sensitivas típicamente liberan neuropéptidos, como el VIP, la SP o el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) sobre las células ganglionares.

Existen notables diferencias entre los distintos ganglios y en cada ganglio entre las diversas especies animales respecto a la forma y tamaño de los somas neuronales y al número y tamaño de las dendritas. Cada neurona ganglionar puede estar inervada por una o varias fibras preganglionares (*convergencia*; en los ganglios simpáticos humanos alrededor de 200 fibras presinápticas convergen en cada neurona ganglionar) y cada fibra preganglionar puede a su vez hacer sinapsis con múltiples neuronas ganglionares (*divergencia*; habitual en todos los ganglios autónomos) (**Figura 1.22**). La convergencia resulta necesaria para que la neurona ganglionar pueda integrar los estímulos procedentes del SNC y actuar como filtro de los mismos, mientras que la divergencia permite sincronizar la actividad de grupos de neuronas ganglionares.

En la práctica, la respuesta de una célula ganglionar a la estimulación preganglionar consiste en una secuencia de potenciales sinápticos que pueden ser causados por mediadores distintos y que son un buen reflejo del conjunto de receptores y canales expresados en esa célula. Inicialmente cabe distinguir un potencial sináptico excitador rápido (*fast excitatory postsynaptic potential*; fEPSP) de breve duración (10-20 ms) y amplitud de hasta 20 mV, dependiente de la activación de nAChRs, aunque en algunos ganglios depende de la activación de receptores de serotonina 5-HT₃ y purinérgicos P2X y cuya función es la de desencadenar un potencial de acción en la neurona

ganglionar. Se han identificado tres vías para la generación de fEPSPs: i) centrífuga: presente en todos los ganglios, está formada por las fibras preganglionares y la neuronas ganglionares, ii) refleja periférica: común en los ganglios extramurales y formada por fibras que proceden de neuronas situadas en órganos periféricos que hacen sinapsis nicotínicas en las neuronas ganglionares y, iii) intrínseca: presente exclusivamente en los ganglios intramurales y formada por neuronas espontáneamente activas e interneuronas.

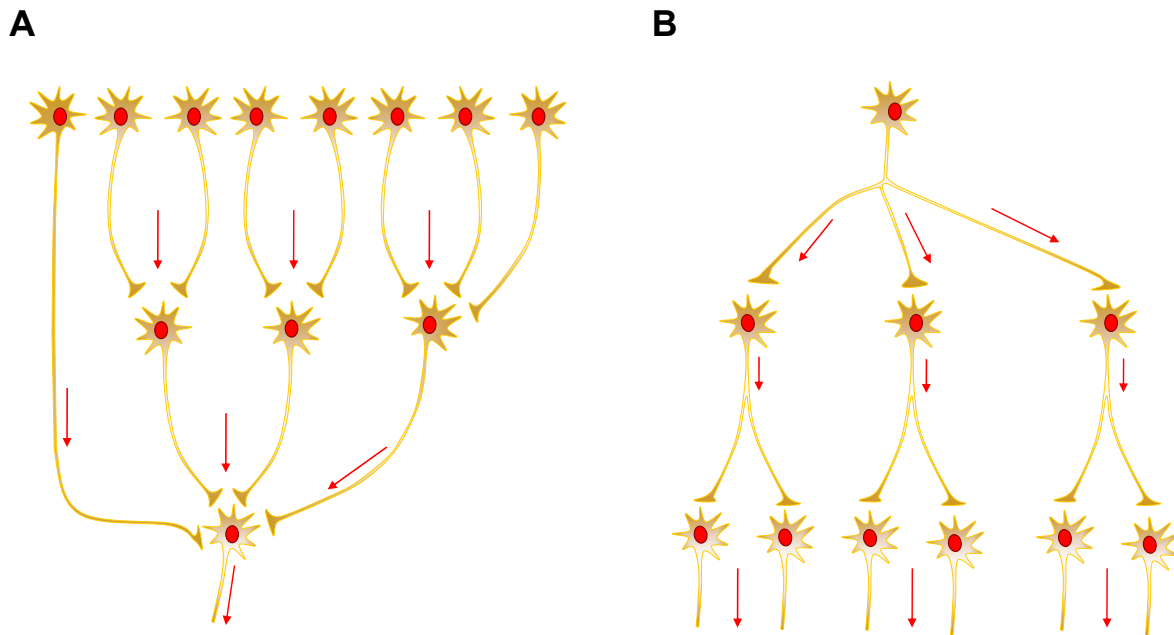


Figura 1.22. Patrones de inervación de las neuronas ganglionares en los ganglios autónomos. **A.** Representación esquemática de un patrón convergente en el que cada neurona ganglionar puede estar inervada por más de una fibra preganglionar. **B.** Representación esquemática de un patrón divergente en el que las fibras preganglionares se ramifican y hacen sinapsis con varias neuronas ganglionares.

En los ganglios autónomos la mayoría de las sinapsis entre las fibras preganglionares y las neuronas ganglionares son axodendríticas en vez de axosomáticas. El soma neuronal es donde se generan los potenciales de acción, por lo que el fEPSP producido en las dendritas debe propagarse electrotonicamente (en función de las constantes de tiempo y espacio de las dendritas) hasta el soma y superar allí el umbral para la generación del potencial de acción. En consecuencia, el hecho de que la mayoría de las sinapsis se establezcan en las dendritas confiere a la neurona ganglionar especiales capacidades integrativas (en virtud de la complejidad del árbol dendrítico y de la distancia entre los lugares de generación de los fEPSPs y el soma, los fEPSPs pueden sumarse temporal y espacialmente en el soma para originar un potencial de acción). La probabilidad de que un potencial de acción presináptico se transmita a la neurona ganglionar (eficacia sináptica) depende fundamentalmente de la cantidad de neurotransmisor que se libere y del umbral de generación del potencial de acción en

el soma de la neurona ganglionar (Van der Kloot y col., 2002). La eficacia sináptica puede calcularse como el producto del número de fibras preganglionares que convergen en una neurona ganglionar, el *contenido cuantal* (número de cuantos liberados, relacionado con la cantidad total de moléculas del neurotransmisor liberado por impulso) y la despolarización producida por cada cuanto de neurotransmisor (*potencial unitario*). Éste último depende a su vez del número de nAChRs susceptibles de ser activados y de la resistencia de la membrana. En general, los ganglios autónomos que poseen un elevado factor de seguridad en la transmisión sináptica (cada estímulo presináptico genera un potencial de acción postsináptico) presentan escasa convergencia, por lo que la transmisión sináptica depende del contenido cuantal (generalmente, elevado) y del potencial unitario. El valor del contenido cuantal es muy variable (1-50) en los distintos ganglios, siendo necesaria la convergencia de múltiples fibras presinápticas para que puedan generarse potenciales de acción en los que poseen un bajo contenido cuantal.

En las neuronas que están inervadas por una sola fibra presináptica, el fEPSP generado por un estímulo preganglionar único tiene una morfología sencilla y suele ser capaz de producir un potencial de acción. Cuando las neuronas reciben inervación múltiple, suelen responder al estímulo de cada fibra presináptica generando un fEPSP pequeño, incapaz de producir un potencial de acción; solamente cuando las distintas fibras presinápticas descargan a alta frecuencia o sincrónicamente, la suma temporal o espacial de los distintos fEPSP se traduce en la producción de un potencial de acción.

La respuesta de una neurona ganglionar del sistema nervioso autónomo varía en función del patrón de estimulación de las fibras preganglionares. En respuesta a la ACh liberada por un único estímulo presináptico se produce un fEPSP de breve duración y, eventualmente, el disparo de un potencial de acción postsináptico. Sin embargo, en respuesta a un tren de estímulos a frecuencia fisiológica (1-20 Hz) en la neurona ganglionar se generan, además de los fEPSP, potenciales de larga duración (lentos) y pequeña amplitud (≈ 5 mV), tanto inhibidores (*slow inhibitory postsynaptic potential*; sIPSP) como excitadores (EPSP). Los sIPSP se prolongan a lo largo de cientos de ms y han sido atribuidos a la disminución de la conductancia de Na^+ de la membrana de la célula ganglionar. Sin embargo, en algunos ganglios dicho potencial se ha relacionado con la presencia de células pequeñas intensamente fluoprescentes (SIF), un tipo de interneuronas que liberan CAs en respuesta a la activación de mAChRs (en este caso, el potencial sináptico inhibitorio (IPSP) es sensible a atropina), o con la apertura de canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} de tipo SK secundaria a la liberación de Ca^{2+} desde depósitos intracelulares.

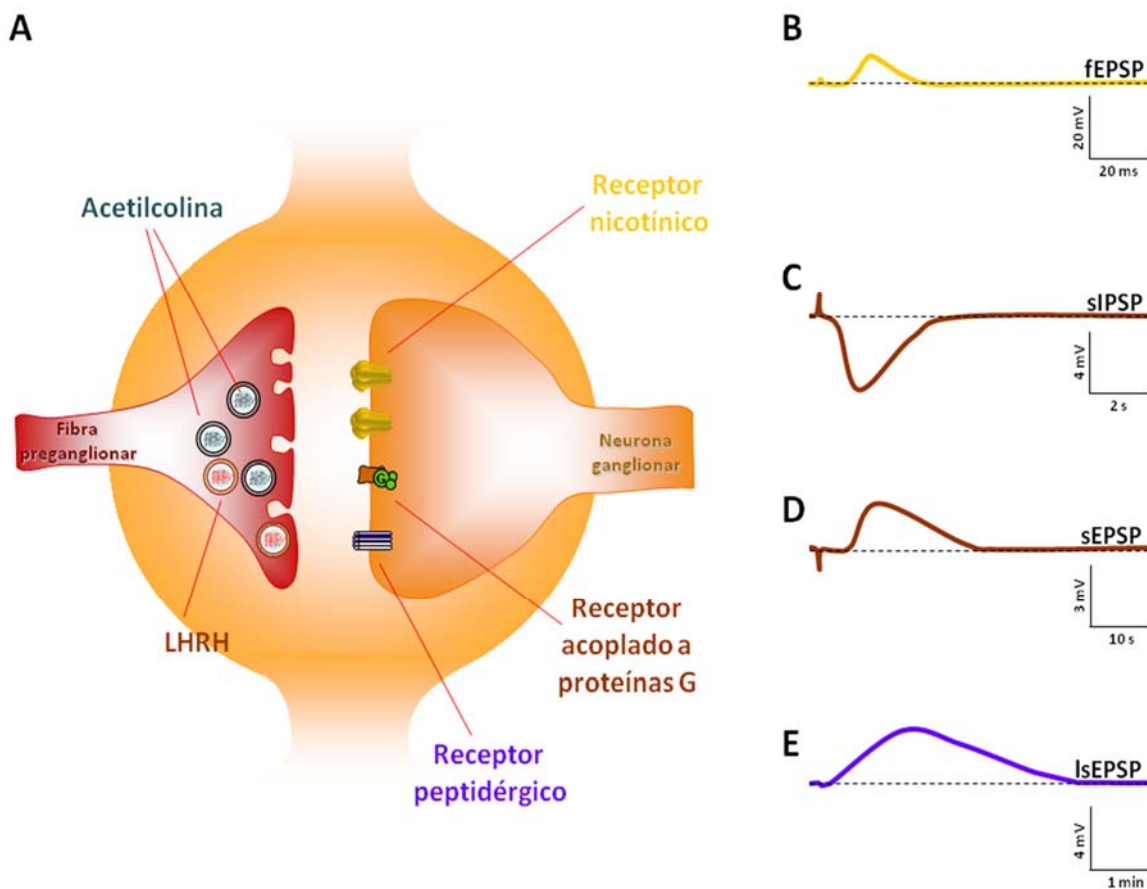


Figura 1.23. Transmisión sináptica en el ganglio simpático de la rana. **A.** Principales neurotransmisores y receptores implicados en la transmisión ganglionar. **B-E.** Registros intracelulares de las diferentes respuestas de las neuronas ganglionares inducidas por la estimulación eléctrica de las fibras preganglionares. Obsérvese la existencia de un artefacto producido por la estimulación al inicio de los registros representados en **B**, **C** y **D**, así como las distintas escalas de tiempo utilizadas. Los colores empleados en los registros de los paneles **B-E** coinciden con los empleados en los receptores presumiblemente implicados en su génesis (véase el texto). fEPSP: potencial sináptico excitador rápido; sIPSP: potencial sináptico inhibitor lento; sEPSP: potencial sináptico excitador lento; lsEPSP potencial sináptico de larga duración; LHRH: hormona liberadora de la hormona luteinizante (Adaptada de (Iversen, 2000; Badía y Baños, 2003).

Los EPSPs lentos son producidos tanto por la ACh liberada por las terminaciones de las fibras preganglionares, que vía mAChRs despolariza la membrana celular durante segundos (*slow* EPSP; sEPSP), como por la SP procedente de terminaciones nerviosas de fibras sensitivas que altera la excitabilidad de las neuronas ganglionares durante largos períodos de tiempo (minutos; *late slow* EPSP; lsEPSP). En los ganglios de los anfibios esta última función la ejercería la hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH) que se colibera con la ACh desde algunas fibras preganglionares (**Figura 1.23**).

Los sEPSPs colinérgicos y los lsEPSP peptidérgicos resultan del cierre de los canales de K^+ de tipo M y de la apertura de canales de Na^+ y Ca^{2+} , respectivamente. La disminución de la corriente M se traduce en dos efectos: despolarización sostenida de la célula (sEPSP) con aumento de la

resistencia de la membrana, y prolongación –al disminuir el efecto repolarizante de la corriente M– de la duración de los fEPSP. Ambos fenómenos conducen a que un potencial de acción presináptico sea entonces capaz de producir un tren de potenciales de acción postsinápticos, convirtiendo el patrón de descarga de las neuronas ganglionares de fásico en tónico. Es de destacar que dicho patrón resulta relevante de cara a la regulación de los órganos efectores del sistema nervioso autónomo. Así, las neuronas simpáticas que inervan el iris presentan un patrón de respuesta fásico, adecuado para producir una midriasis con carácter intermitente. Por el contrario, las neuronas simpáticas que controlan el tono de los vasos sanguíneos presentan patrones de carácter tónico, con frecuencia de descarga variable (lo cual influye también en la posible liberación de péptidos en las uniones neuroefectoras) en función del grado de vasoconstricción que se pretenda conseguir.

1.5.1.1. nAChRs implicados en la transmisión ganglionar

La densidad y tipo de los nAChRs puede condicionar el funcionamiento de los ganglios del sistema nervioso autónomo (SNA) acutando sobre diversos parámetros (factor de seguridad de la transmisión sináptica, duración de ls fEPSPs, etc.). En líneas generales, la densidad de los nAChRs es mayor en los ganglios simpáticos que en los parasimpáticos, lo que condiciona diferencias en la sensibilidad a los fármacos bloqueantes ganglionares. En los ganglios autónomos sólo se ha descrito la expresión de las subunidades $\alpha 3$ (presente en todos los ganglios), $\alpha 5$, $\alpha 7$, $\beta 2$ y $\beta 4$ (más abundante que las $\beta 2$). La subunidad $\alpha 3$ es crucial para que puedan generarse fEPSP y su falta de expresión en ratones KO da lugar, en el reducido número de animales supervivientes, a alteraciones en el desarrollo y función del tubo digestivo y tracto urinario con la aparición de un fenotipo similar al del complejo megacistis-microcolon-hipoperistaltismo intestinal, una enfermedad humana autosómica recesiva en la que no se expresa la subunidad $\alpha 3$ de los nAChRs. A este respecto es de destacar también la existencia en el ámbito de la clínica humana de una neuropatía autonómica paraneoplásica que cursa con taquicardia postural y alteraciones de la motilidad digestiva, en la que se han encontrado autoanticuerpos frente a la subunidad $\alpha 3$. Por el contrario, los animales KO para cualquiera de las otras subunidades – $\alpha 5$, $\alpha 7$, $\beta 2$ o $\beta 4$ – de los nAChRs ganglionares, no manifiestan alteración funcional alguna. Ello sugiere que la carencia de cualquiera de ellas es compensada funcionalmente por las restantes. Así, aunque los nAChRs $\alpha 3\beta 4$ son los principales nAChRs heteroméricos de los ganglios autónomos, la carencia de la subunidad $\beta 4$ puede ser compensada por la sobreexpresión de la subunidad $\beta 2$, con la consiguiente mayor formación de los heterómeros $\alpha 3\beta 2$. Sin embargo, la carencia conjunta de las subunidades $\beta 2$ y $\beta 4$ no puede ser compensada, generándose un fenotipo similar al de los ratones KO para la subunidad $\alpha 3$.

La subunidad $\alpha 7$ parece ser importante en la transmisión ganglionar en etapas tempranas del desarrollo. En el ganglio cervical superior del pollo (Yu y Role, 1998) y de la rata (Cuevas y col.,

2000) se han descrito dos tipos de respuestas nicotínicas sensibles a α -BgTx: una rápidamente desensibilizante y bloqueable de forma irreversible por dicha toxina, y otra que se desensibiliza más lentamente y se bloquea reversiblemente por α -BgTx. La primera ha sido atribuida a nAChRs $\alpha 7$ homoméricos, mientras que la segunda se ha relacionado con nAChRs $\alpha 7$ heteroméricos. A partir de la modificación de los barorreflejos observada en los ratones KO para la subunidad $\alpha 7$, se ha sugerido que los nAChRs $\alpha 7$ podrían participar en la regulación autonómica de la presión arterial.

1.5.2. La transmisión en la médula adrenal

El estímulo fisiológico para la secreción de CAs por las células cromafines es la ACh liberada por las terminaciones del nervio esplácnico (Douglas, 1968; Kidokoro y Ritchie, 1980; Wakade, 1981). Aunque la relación entre la actividad eléctrica de la membrana, el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ y la exocitosis ha sido objeto de numerosos estudios a nivel de célula cromafín única, tanto en cultivos celulares como en cortes de la glándula adrenal (Augustine y Neher, 1992; Voets y col., 1999; Albillos y col., 2000; Voets, 2000; Elhamdani y col., 2001; Chan y col., 2005; Fulop y col., 2005; Pérez-Álvarez y Albillos, 2007), son prácticamente inexistentes los trabajos en los que se aborda el estudio del acoplamiento excitación-secreción en las células cromafines inducido por la estimulación de las fibras simpáticas preganglionares y se mida alguna respuesta celular (potencial de membrana, $[Ca^{2+}]_i$, etc.) además de la secreción de CAs. Por ello, sorprende que casi 80 años después de que Feldberg y Vartiainen (Feldberg y Vartiainen, 1934) demostraran que la ACh liberada durante la estimulación del nervio esplácnico promueve la secreción de A por la glándula adrenal del gato, todavía desconozcamos cómo operan la mayoría de las moléculas efectoras (nAChRs, mAChRs, canales Na_v , K_v y Ca_v , etc.) de la respuesta secretora en condiciones fisiológicas.

Además del estímulo colinérgico (nicotínico y/o muscarínico), los estímulos de carácter peptídico son capaces de controlar la secreción de CAs durante la estimulación eléctrica de la glándula adrenal. Sustancias como el VIP, el PACAP y la SP son liberadas por las terminaciones de las fibras sensitivas o preganglionares simpáticas y actúan sobre receptores situados en la membrana de las células cromafines (Dun y col., 1996).

Varias líneas de investigación han puesto de manifiesto que las células cromafines adrenérgicas y noradrenérgicas están bajo el control de circuitos neuronales morfológica y funcionalmente distintos. En el ratón, las terminaciones nerviosas de las neuronas simpáticas preganglionares que inervan las células cromafines adrenérgicas difieren ultraestructuralmente de las que inervan las células noradrenérgicas (Grynszpan-Winograd, 1974). Además, la calretinina, una proteína fijadora de Ca^{2+} , parece constituir un marcador inmunocitoquímico de las neuronas preganglionares localizadas en la vecindad de las células cromafines noradrenérgicas de la médula adrenal del gato, ya que se encuentra ausente de las que inervarían a las células adrenérgicas

(Edwards y col., 1996). Otra diferencia funcional se evidencia al estimular directamente las fibras del nervio esplácnico (Klevans y Gebber, 1970; Edwards y Jones, 1993). Ambos tipos de neuronas preganglionares difieren en sus patrones de descarga tras la estimulación de neuronas premotoras simpáticas localizadas en núcleos hipotalámicos como el ventrolateral rostral. Así las neuronas que inervan las células cromafines adrenérgicas presentan un patrón de descarga bifásico con una baja probabilidad de disparo inicial seguida de un incremento continuo de la misma (**Figura 1.24A**). A diferencia de ellas, las neuronas que inervan las células cromafines noradrenérgicas responden a la estimulación hipotalámica con un aumento drástico y breve de la probabilidad de descarga, seguido de un periodo de descenso pronunciado o incluso de silencio eléctrico (**Figura 1.24B**) (Morrison y Cao, 2000). En función de la frecuencia de estimulación, la secreción estará dominada por la A o por la NA, lo que sugiere que ambas poblaciones celulares están reguladas por diferentes rutas preganglionares. Finalmente, también el tipo de estímulo estresante influye de forma diferencial en la respuesta secretora de CAs por la médula adrenal. La hipoglucemia inducida por insulina o por 2-deoxiglucosa promueve la secreción mayoritariamente adrenérgica (Sun y col., 1979; Gagner y col., 1985; Vollmer y col., 1992; Scheurink y Ritter, 1993; Vollmer y col., 1997), mientras que, la exposición aguda al frío induce una secreción preferentemente noradrenérgica (Vollmer y col., 1992).

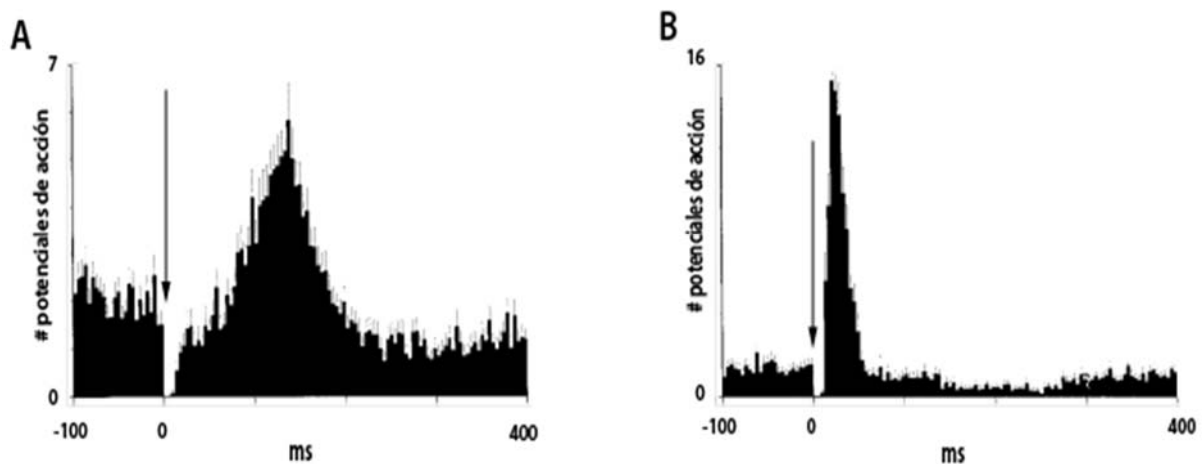


Figura 1.24. Patrón de descarga de potenciales de acción de las neuronas preganglionares (NPS) que inervan las células cromafines adrenérgicas o noradrenérgicas en respuesta a la estimulación eléctrica del núcleo ventrolateral rostral del gato. **A.** Descarga de las NPS que inervan células cromafines adrenérgicas. Se observa una baja probabilidad inicial de descarga, durante los primeros 80 ms tras la estimulación, seguida de un incremento progresivo de la misma durante los 100 ms siguientes. **B.** Descarga de las NPS que inervan células cromafines noradrenérgicas. Se observa un aumento drástico y breve de la frecuencia de descarga durante los 20-40 ms siguientes a la estimulación, seguido de un periodo de baja frecuencia o silencio eléctrico. Las flechas verticales indican el momento en que se estimula el núcleo ventrolateral rostral (Tomada de (Morrison y Cao, 2000)).

1.5.2.1. Organización anatomo-funcional de la médula adrenal

El empleo –a veces combinado– de técnicas histológicas, electrofisiológicas y ópticas ha posibilitado la comprensión del funcionamiento de las células cromafines en el seno del tejido adrenomedular. En los años 40 del pasado siglo, Hillarp (Kajiwara y col., 1997) propuso que las células cromafines en la glándula adrenal de la rata se agrupan en estructuras globulares de 80 μm de diámetro rodeadas de tejido conectivo, que denominó *islotes cromafines*. Las *islotes cromafines* reciben inervación de fibras preganglionares amielínicas (0,4-1 μm de diámetro) del nervio esplácnico que se originan en neuronas situadas en las astas intermediolaterales de los segmentos T7-T12 de la médula espinal (Coupland, 1965; Holets y Elde, 1982) y disparan potenciales de acción a frecuencias que oscilan entre 0,1 Hz, en condiciones de reposo, y 50 Hz, en situaciones de estrés (Beacham y Perl, 1964). Además, en la superficie de cada célula cromafín es posible identificar 1-4 botones sinápticos de 1-3 μm de diámetro cada uno (Coupland, 1965; Kajiwara y col., 1997). Por otra parte, mediante el uso de colorantes potenciométricos (5H-155) se ha analizado la actividad eléctrica de las células cromafines en cortes de la glándula de la rata (Iijima y col., 1992; Kajiwara y col., 1997). Es de destacar la ausencia de cambios espontáneos de la señal luminosa en los cortes de tejido que, no obstante, tras la estimulación de las fibras del nervio esplácnico se despolarizan de forma circunscrita a determinadas regiones del tejido con tamaño similar al de los islotes cromafines previamente identificados histológicamente. Estos resultados han sido interpretados en el sentido de que, *in situ*, las células cromafines constituyen grupos funcionales de aproximadamente 100 elementos que sincronizan su actividad eléctrica en función de una inervación común (un máximo de 3 ó 4 fibras inervan todas las células del grupo –gran divergencia a nivel del grupo y pequeña convergencia a nivel de cada célula) y de la existencia de un débil acoplamiento eléctrico entre ellas.

Conviene señalar que en el animal adulto la función de las células cromafines parece estar fundamentalmente controlada por el SNC (control neurogénico), de manera que el acoplamiento intercelular vía uniones en hendidura (*gap-junctions*) (Grynszpan-Wynograd y Nicolas, 1980; Moser, 1998) ejercería un papel limitado en la sincronización de la actividad eléctrica y amplificación de la respuesta secretora de la médula adrenal. Sin embargo, en todas aquellas situaciones en las que el control neurogénico se encuentra debilitado o ausente (etapa prenatal, y primera semana postnatal denervación quirúrgica y, paradójicamente, en situaciones de estrés), el acoplamiento intercelular se encargaría eficientemente de asegurar la contribución funcional de la médula adrenal al sistema nervioso simpático (Martin y col., 2001; Martin y col., 2003; Colomer y col., 2008b).

1.5.2.2. La neurotransmisión en la unión esplacno-cromafín

La estimulación eléctrica transmural –y también la estimulación focal de las fibras del nervio esplácnico– en un corte de la glándula adrenal de rata o cobaya se asocia sistemáticamente a la aparición de fEPSPs (Holman y col., 1994; Barbara y Takeda, 1996; Kajiwara y col., 1997; Barbara y col., 1998). En función de la dependencia de Ca^{2+} extracelular de los fEPSPs y de su sensibilidad a hexametonio, cabe concluir que los fEPSP se deben a liberación de ACh desde las terminaciones nerviosas de las fibras preganglionares y a la activación de nAChRs localizados en la membrana de las células cromafines. Además, en todas las células en las que la estimulación eléctrica induce fEPSPs también se observan potenciales de acción superpuestos. Ello refleja el elevado margen de seguridad de la transmisión sináptica en la unión esplacno-cromafín debido a la elevada resistencia de acceso –en el rango de los $\text{G}\Omega$ – de las células cromafines y a la importante magnitud –0,2 a 1 nA– de las correspondientes EPSCs.

Las EPSCs inducidas mediante estimulación eléctrica del nervio esplácnico presentan latencias (en relación al estímulo) de 1-6 ms, tiempos de ascenso (10-90%) de 1-2 ms y decaen monoexponencialmente con constantes de tiempo entre 5 y 15 ms (potencial de fijación (V_h), de -60 mV); este último valor es dependiente de voltaje –se reduce al despolarizar– y generalmente independiente de la amplitud de la corriente (Holman y col., 1995; Kajiwara y col., 1997). Una excepción a esta última afirmación vendría dada por las EPSCs de mayor tamaño (> 800 pA) en las que es posible identificar una segunda constante de tiempo (> 50 ms) que resultaría de la activación de nAChRs extrasinápticos (Barbara y Takeda, 1996). La similitud entre la duración de las EPSCs y la de una ráfaga de apertura (*burst*) de los nAChRs de las células cromafines bovinas (Maconochie y Knight, 1992), sugiere que la ACh liberada desde las terminaciones del nervio esplácnico se uniría una sola vez a los nAChRs presentes en las células cromafines y que la fase de caída de las EPSCs está determinada por la duración de las aperturas de los receptores y no por su desensibilización.

Típicamente, el incremento moderado de la frecuencia de estimulación nerviosa (desde 1 hasta 10 Hz) conlleva un aumento en paralelo de la frecuencia de los fEPSPs, por lo que probablemente la desensibilización de los nAChRs no desempeña un papel relevante en estas condiciones experimentales. La variación de la intensidad del estímulo se asocia también a cambios escalonados en la latencia, velocidad de ascenso, amplitud y duración de los fEPSPs, indicativos del reclutamiento de un mayor número de fibras preganglionares (2-4 fibras), y a la descarga de un número mayor de potenciales de acción en respuesta a cada estímulo (descarga fásica de 2-4 potenciales de acción).

El análisis cuantal en la sinapsis esplacno-cromafín se ha realizado a partir de EPSCs espontáneas (sEPSCs) registradas en presencia de tetrodotoxina (TTX) y alto -25 mM K^+ extracelular. Los histogramas de amplitud de las sEPSCs son multimodales, con un primer pico centrado en 20-25 pA, que posiblemente refleja el tamaño cuantal de la sinapsis (Barbara y Takeda,

1996; Kajiwara y col., 1997; Colomer y col., 2010). Teniendo en cuenta este valor y una conductancia unitaria de los nAChRs de 43 pS (estimada mediante análisis del ruido asociado a las sEPSCs) se calcula que un cuanto de ACh activa una media de siete nAChRs. Por otra parte, considerando el tamaño de las EPSCs inducidas eléctricamente (hasta 1 nA), el número de botones sinápticos por célula cromafín (hasta 4) y el tamaño cuantal, cabe deducir que cada estímulo eléctrico del nervio esplácnico puede liberar varias decenas de vesículas de un solo botón sináptico.

Actualmente disponemos de escasa información sobre la farmacología de la sinapsis esplacno-cromafín. Es de destacar la capacidad del hexametonio, la mecamilamina, la dihidro- β -eritroidina (Barbara y Takeda, 1996; Kajiwara y col., 1997), de la α -BgTx (Martin y col., 2003) y de la α -RgIA (Colomer y col., 2010) para bloquear las sEPSCs, lo que implica a nAChRs formados por las subunidades $\alpha 3$, $\alpha 7$, $\alpha 9$ y $\alpha 10$ en la generación de esas corrientes sinápticas. Resulta también digna de reseñarse, la existencia de cambios en la expresión diferencial de nAChRs formados por dichas subunidades, de manera que durante la edad fetal predominarían los constituidos por la subunidad $\alpha 3$ y en la vida adulta los formados por las subunidades $\alpha 3$ y $\alpha 7$ (Martin y col., 2005a). Cabe señalar que el patrón de estimulación empleado en los experimentos farmacológicos (estímulos eléctricos únicos o despolarizaciones prolongadas con 20-40 mM de K^+ extracelular) no facilita la liberación desde las terminaciones del nervio esplácnico de neuropéptidos (SP, VIP) que pudieran influir en la fisonomía de las EPSCs y en su sensibilidad a los antagonistas nicotínicos. Respecto al papel de los mAChRs en la transmisión en la unión esplacno-cromafín, baste indicar que la administración de muscarina induce inicialmente una hiperpolarización (IPSP) de las células cromafines en la glándula adrenal de la rata con supresión de la descarga espontánea de potenciales de acción (Barbara y col., 1998; Olivos y Artalejo, 2008).

1.6. LA GLÁNDULA ADRENAL Y EL ESTRÉS

1.6.1. El estrés

A pesar de que la noción de estrés se remonta a 100 años atrás y de los numerosos trabajos de investigación realizados desde entonces tanto sobre los aspectos básicos como sobre las enfermedades relacionadas con el mismo, todavía no existe una definición científica adecuada de este término. Ello no es óbice para que comúnmente se identifique al estrés con la *condición resultante* y al término estresor con el *estímulo causante* de un conjunto de respuestas nerviosas, neuroendocrinas, metabólicas y comportamentales que, contrariamente a lo que suele asumirse, manifiestan una notable variabilidad e incluso especificidad en función del tipo de estresor.

En la actualidad desconocemos buena parte de los mecanismos implicados en la activación catecolaminérgica que acompaña a la respuesta del organismo a diferentes estresores procedentes tanto del ambiente como del medio interno. En particular, debemos mejorar nuestra comprensión de

los mecanismos que intervienen en la conversión de respuestas de estrés de breve duración y carácter beneficioso en respuestas prolongadas, tanto adaptativas como maladaptativas, y avanzar en el conocimiento de procesos como el condicionamiento adaptativo en virtud del cual la exposición a un estímulo determinado modifica la respuesta a ese mismo estímulo o a un estímulo diferente. Todos ellos son aspectos fundamentales para comprender el significado del sistema nervioso autónomo en condiciones fisiológicas y patológicas.

1.6.1.1. Evolución del concepto de estrés

Los primeros estudios sobre lo que hoy en día conocemos como respuesta de estrés datan de 1932, cuando Walter Cannon aborda el análisis de los efectos de la A en animales de experimentación y en el hombre. Cannon introduce también el término *homeostasia* para describir el conjunto de procesos de autorregulación que posibilitan el mantenimiento dentro de márgenes fisiológicos de las propiedades y composición del medio interno (Cannon, 1929). Además, este investigador fue el primero que hizo referencia a la especificidad de la respuesta de estrés, mostrando, por ejemplo, que la respuesta homeostática a la falta de oxígeno difiere de la respuesta a la exposición al frío. Aunque Cannon nunca empleó la palabra estrés, defendía que los estímulos estresantes son aquellos capaces de alterar la homeostasia. Cannon consideraba que la médula adrenal y las neuronas postganglionares simpáticas funcionan como una unidad, cuyas acciones estaban mediadas por la A, visión ésta que fue corregida por von Euler al identificar a la NA como el transmisor liberado por las terminaciones de las fibras nerviosas postganglionares (Von Euler, 1946). Curiosamente, la existencia de dos mediadores distintos no ha sido impedimento para que aún hoy en día siga prevaleciendo una visión unitaria del sistema nervioso simpático a pesar de la existencia de múltiples evidencias de una regulación diferenciada del sistema simpatoadrenal y del simpatoneuronal (Kvetnansky y col., 1998; Pacak y col., 1998; Pacak y Palkovits, 2001; Goldstein y Kopin, 2007).

Fue el eslovaco Hans Selye quien introdujo el término estrés, popularizándolo tanto en el ámbito científico como social (Selye, 1936; Selye, 1950; Selye, 1974). Para Selye el *estrés* es la *respuesta no específica del organismo ante cualquier demanda del medio* y se manifestaría mediante el síndrome general de adaptación (SGA). Selye también acuñó el término *distrés*, que definió como un *estrés de índole desagradable o nocivo para el organismo*. A este respecto, propuso que las respuestas de estrés inadecuadas, excesivas y/o prolongadas, podían derivar en lo que consideró como *enfermedades de la adaptación*. A nivel experimental se manifiestan mediante la denominada *triada patológica* consistente en hipertrofia adrenal, ulceración gastrointestinal e involución tímico-linfática, cuya aparición dependería de la intensidad y duración de la exposición al agente estresante. A diferencia de Cannon, que enfatizó el papel de la A y de la médula adrenal, Selye consideró al eje

HPA como el efector clave de la respuesta al estrés y, consiguientemente, destacó la participación de los GC (cortisol y CORT) en la misma.

Actualmente se concibe el estrés como una amenaza a la homeostasia que se manifiesta con cierto grado de especificidad dependiente, entre otros aspectos, del agente estresante, de la percepción del mismo por el individuo y de la capacidad de éste para hacerle frente (McEwen y Stellar, 1993; Pacak y col., 1998; Goldstein y McEwen, 2002; Goldstein y Kopin, 2007). Dicha especificidad se basaría en la existencia de patrones diferenciados en la respuesta secretora de cortisol, A y NA (Pacak y Palkovits, 2001; Goldstein, 2003). Posiblemente, la definición más aceptada –o al menos, la más frecuentemente recogida en la literatura– de estrés sea la de Goldstein (Goldstein, 1995), que lo considera una *condición en la que las expectativas del sujeto, tanto si están programadas genéticamente como si son consecuencia de un proceso de aprendizaje, no coinciden con las percepciones presentes o anticipadas provenientes del medio interno y/o externo, siendo esta discrepancia entre lo que se observa o siente y lo que se espera la que desencadena una respuesta compensadora de estrés*. Para ello, el organismo dispondría de numerosos comparadores orgánicos denominados homeostatos que regularían de manera conjunta o independiente la actividad de los distintos sistemas efectores. Por otra parte, Goldstein emplea el término *distrés* como una forma de estrés con características adicionales como la consciencia, índole aversiva y activación del eje HPA y del sistema simpatoadrenomedular.

1.6.1.2. Síndrome general de adaptación y alostasia

Como ya ha sido mencionado, el SGA fue descrito por Selye como el conjunto de respuestas no específicas inducidas por cualquier estímulo estresante. En el desarrollo del SGA se describen tres fases: i) alarma, ii) resistencia y iii) agotamiento (**Figura 1.25**). Durante la fase de alarma pueden ocurrir reacciones generales no específicas, como el choque con hipotensión arterial, inmovilización, alerta cognitiva y aumento del tono muscular. Casi simultáneamente, se produce la activación del sistema nervioso simpático con la liberación de NA y A, lo que aumentaría la capacidad de respuesta motora del organismo gracias, entre otros procesos, a la broncodilatación, al incremento de la frecuencia cardíaca y de la presión arterial o de la glucemia. El 95% de la A circulante procede de la médula adrenal mientras que la NA procede en un 30% de esta fuente y el resto de las terminaciones nerviosas simpáticas. Tras esta primera fase, el organismo responde al estímulo estresante oponiéndose y/o adaptándose al mismo, lo que constituye la fase de resistencia o adaptación. Durante la misma se produce el aumento de los niveles de CRH, ACTH, cortisol y hormona del crecimiento (GH). Si en presencia continuada del estímulo, el organismo no lograra recuperar la situación basal podría desembocar en la fase de agotamiento, con la desaparición de la respuesta de los sistemas efectores.



Figura 1.25. Fases del síndrome general de adaptación (Selye, 1946).

Durante las dos primeras fases se activan secuencialmente tres ejes fisiológicos: neural, neuroendocrino y endocrino. El eje neural es responsable del aumento del tono muscular esquelético, la eventual parálisis corporal, la liberación de NA por las terminaciones nerviosas postganglionares del sistema nervioso simpático, con los efectos ya mencionados, y la reacción de alerta cognitiva, mediada por la amígdala y dependiente de la activación del sistema noradrenérgico encefálico. Del eje neuroendocrino depende la secreción de A y NA por la médula adrenal y sus consecuencias orgánicas. El eje endocrino corresponde al eje HPA, responsable de la liberación por la corteza adrenal de GC, cuyas acciones a medio plazo son esenciales para la vida (**Figuras 1.26 y 1.27**).

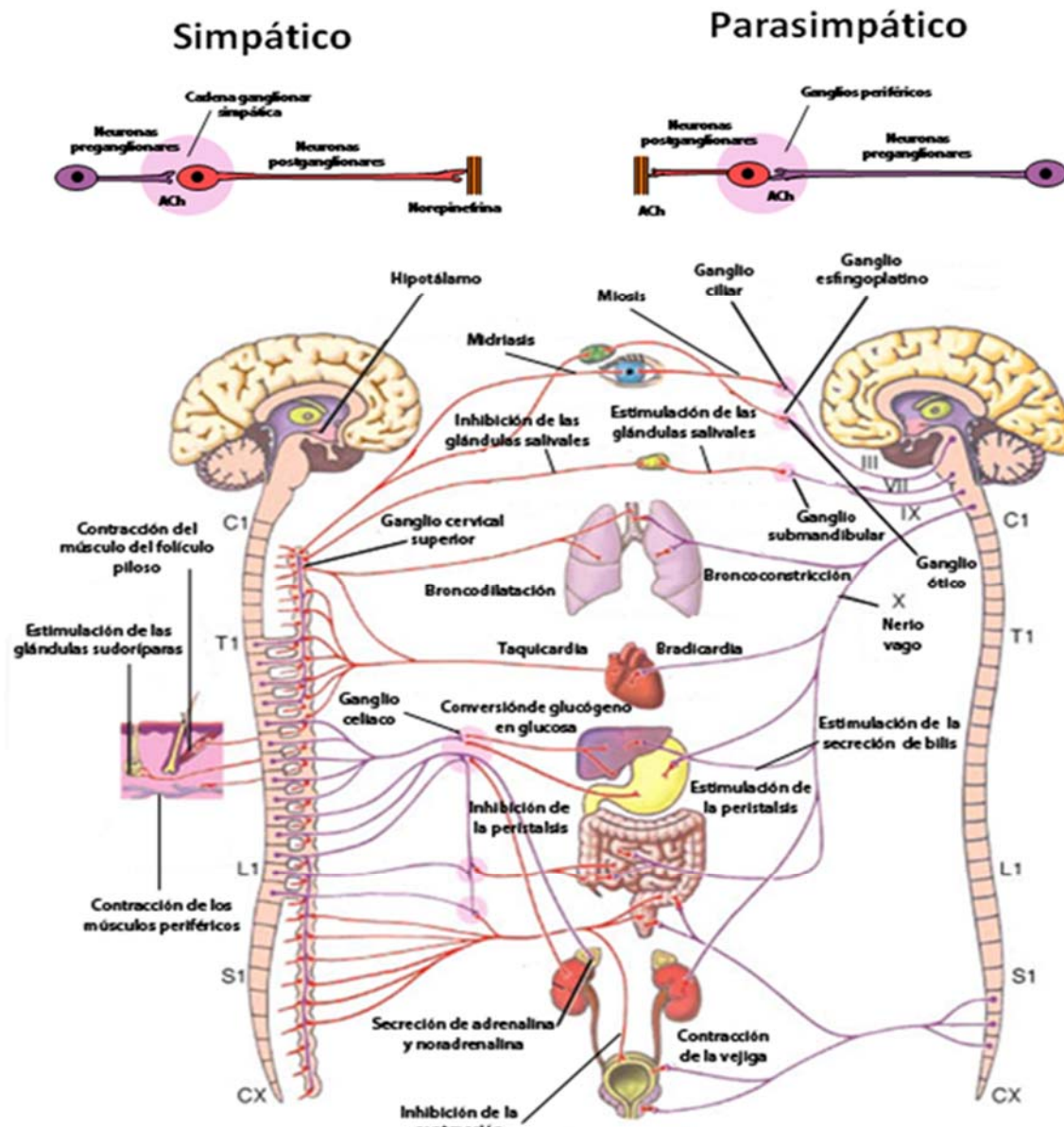


Figura 1.26. Efectos de la activación del SNA. El panel de la izquierda muestra la división simpática. Los cuerpos celulares de las neuronas preganglionares simpáticas (en azul) se localizan en los segmentos torácico y lumbar (T1- L2) de las astas intermediolaterales de la médula espinal. Sus axones proyectan a los ganglios paravertebrales (cadena simpática) y prevertebrales. Las neuronas preganglionares inervan también las células cromafines de la médula adrenal, que constituyen el sistema suprarrenal. Las neuronas postganglionares (en rojo), emiten largas prolongaciones axonales hasta sus órganos efectores. El panel de la derecha muestra la división parasimpática, que consta de un segmento craneal y de otro sacro (S2-S4). Los cuerpos celulares de las neuronas preganglionares parasimpáticas (en azul) se localizan en el tronco del encéfalo (núcleo de Edinger-Westphal, núcleo salivador inferior y superior, núcleo ambiguo y núcleo dorsal del vago) y sus axones viajan con los nervios craneales III (nervio oculomotor), VII (nervio facial), IX (nervio glosofaríngeo) y X (nervio vago). Las fibras originadas en los segmentos sacros de la médula espinal forman parte de los nervios pélvicos. Sus axones proyectan hacia los ganglios situados en la proximidad (o en el interior) de los órganos diana, por lo que las neuronas parasimpáticas postganglionares (en rojo) poseen unas prolongaciones cortas. El SNA controla las funciones viscerales del organismo al objeto de mantener la homeostasia frente a las alteraciones del medio interno y a los estímulos externos. Los efectos más importantes del sistema nervioso simpático están relacionados con la circulación sanguínea y la respiración. Su estimulación produce un aumento del gasto cardíaco, de la frecuencia respiratoria y del calibre bronquial. Además, se inhibe la función gastrointestinal y se estimula el catabolismo de los principios inmediatos, con aumento de la producción hepática de glucosa. La activación del sistema nervioso parasimpático está orientada, al contrario que la del simpático, a la conservación de la energía. Su estimulación produce una disminución de la frecuencia cardíaca y de la velocidad de conducción aurículo-ventricular. Así mismo, da lugar a la contracción del músculo liso bronquial e intestinal, miosis y al aumento de las secreciones exocrinas.

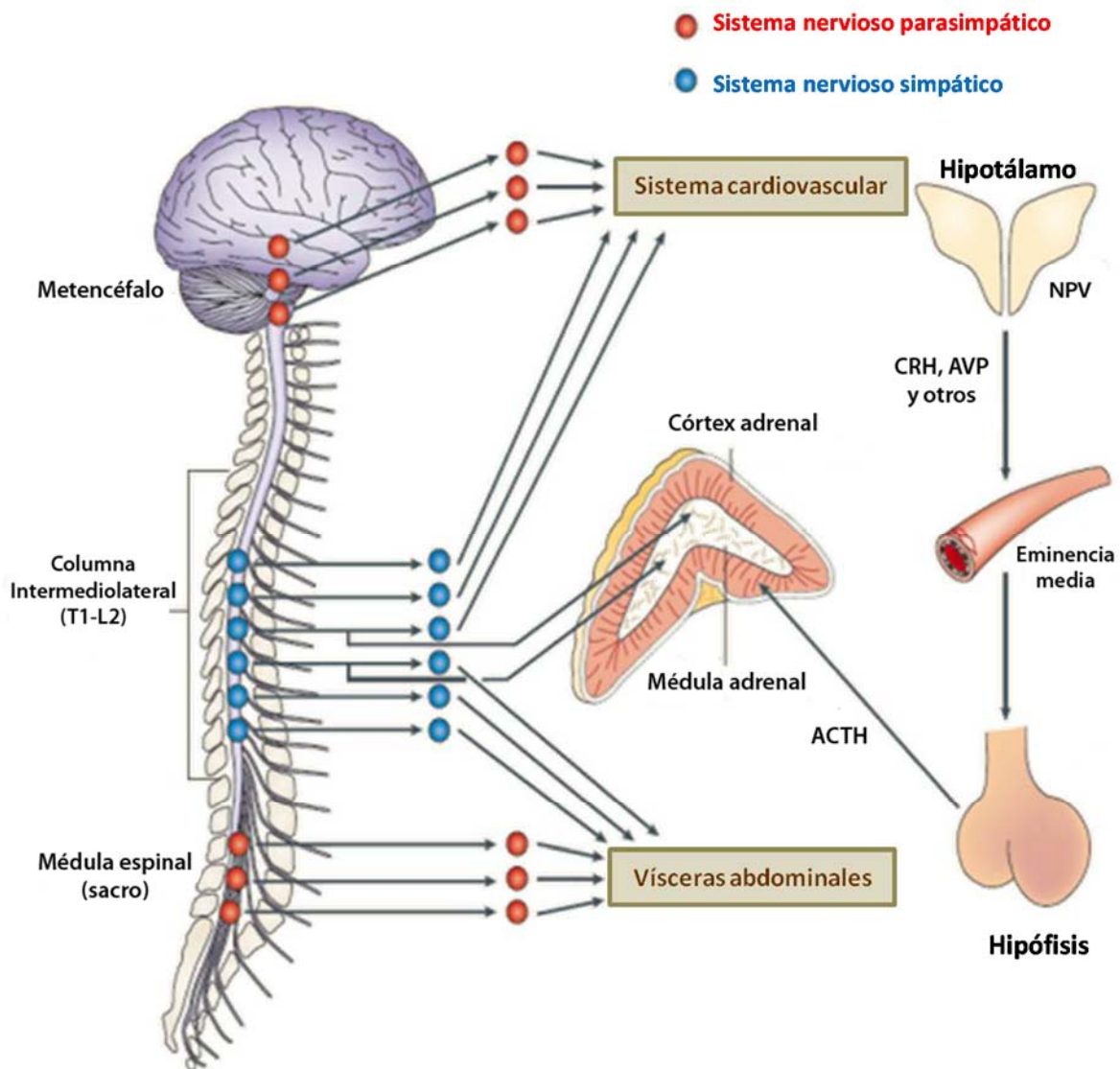


Figura 1.27. Respuesta del eje HPA y del SNA al estrés. El SNA (paneles izquierdo y central) y el HPA (panel derecho) son los sistemas fundamentales para el mantenimiento o reinstauración de la homeostasis durante la respuesta de estrés. La activación simpática es la principal responsable de la clásica respuesta de *lucha o huida* descrita por Walter Cannon y sus colaboradores a principios del siglo XX; se caracteriza por, el aumento de los niveles circulantes de A (proveniente principalmente de la médula adrenal) y NA (proveniente principalmente de las terminaciones nerviosas postganglionares) así como por el aumento del ritmo y fuerza de contracción cardíacos, vasoconstricción periférica, broncodilatación, sudoración y movilización de los depósitos de energía. Las acciones parasimpáticas son generalmente opuestas a las del sistema simpático y predominan en situaciones de sedentarismo o mientras se desarrolla la digestión de los alimentos. La activación del eje HPA comienza en las neuronas hipofisiotróficas del núcleo paraventricular (NPV) del hipotálamo, que secretan la hormona liberadora de corticotropina (CRH) y la arginina-vasopresina (AVP) en la circulación portal de la eminencia media. Esta secreciones son transportadas a la hipófisis anterior donde promueven la liberación de ACTH, que vía circulación sistémica actúa sobre la corteza adrenal (zona fasciculada) iniciando la síntesis y liberación de GC (corticosterona en ratas y cortisol en humanos). Los GC circulantes inducen la movilización de las reservas energéticas y, al tiempo, potencian los efectos mediados por el sistema nervioso simpático. El eje HPA y el sistema nervioso simpático ejercen numerosos efectos complementarios sobre el organismo, incluyendo la movilización de energía y el mantenimiento de la presión sanguínea en las situaciones de estrés.

El impacto del estrés sobre el organismo está relacionado tanto con la intensidad como con la duración del mismo, pudiéndose distinguir dos situaciones: i) estrés **agudo**. Correspondería a la fase de alarma del SGA en la que predominarían los efectos de las CAs secretadas por la médula adrenal y las terminaciones nerviosas del sistema nervioso simpático, aunque no pueden excluirse totalmente efectos a más largo plazo vía activación del eje HPA; ii) estrés **crónico**. Abarca, además de la fase de alarma, la fase de resistencia del SGA. Si el estímulo causante persiste demasiado tiempo o si es muy intenso puede conducir a la fase de agotamiento. El estrés crónico puede producirse como consecuencia tanto de un estrés prolongado como de un estrés agudo repetido a lo largo del tiempo.

Tanto el estrés agudo como el crónico pueden traducirse en respuestas maladaptativas. La moderna psicobiología emplea los términos *alostasia* y *carga o sobrecarga alostásica* para diferenciar las respuestas eficaces de las que no permiten cumplir con su función adaptativa. El término *alostasia* (*conseguir la estabilidad a través del cambio*) fue introducido por Sterling y Eyer (Sterling y Eyer, 1988) para referirse al proceso activo por el que el organismo responde a los sucesos cotidianos para mantener la homeostasia. Por su parte, el concepto de *carga o sobrecarga alostásica* hace referencia al desgaste del organismo causado por una ineficaz gestión alostásica. Habitualmente, la carga alostásica se asocia con respuestas inadecuadas (ausencia de la correcta proporcionalidad en relación con la intensidad del estímulo), diferidas o prolongadas respecto al inicio o duración del estímulo, así como con la incapacidad de mostrar el patrón de facilitación o depresión característico de la respuesta alostásica frente a la estimulación repetida (McEwen y Stellar, 1993; McEwen, 1998; McEwen y Wingfield, 2003) (**Figura 1.28**).

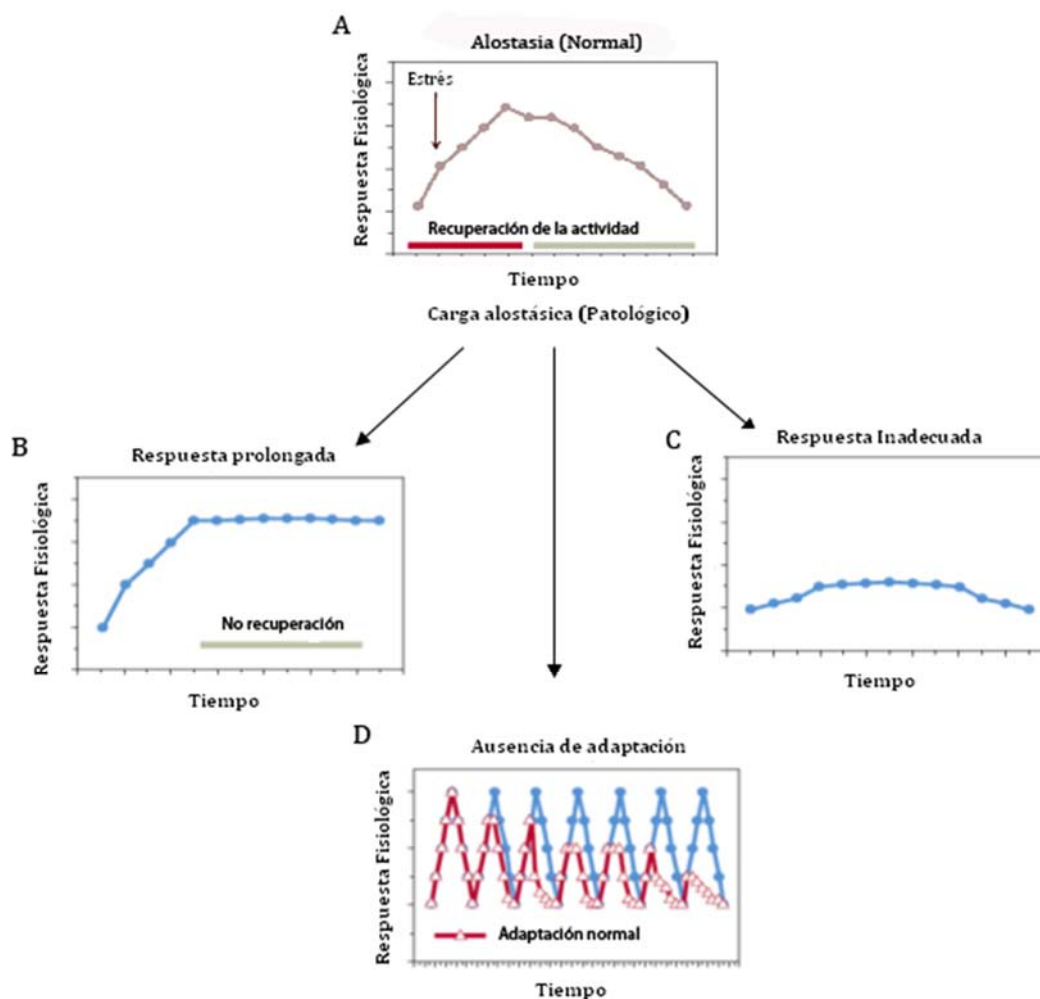


Figura 1.28. Allostasia y carga alostásica. En la parte superior de la figura se muestra la respuesta alostásica normal desencadenada por un estímulo estresante (**A**). Puede observarse como la respuesta fisiológica sigue al estímulo y cesa poco después de la retirada del mismo. Además, su intensidad guarda una relación determinada (proporcionalidad) con la intensidad del mismo. Por el contrario, la carga alostásica frente a estímulos únicos se manifiesta por una respuesta prolongada en el tiempo (**B**) o de magnitud inadecuada (falta de una correcta proporcionalidad) (**C**). Por otra parte, la carga alostásica frente a estímulos repetidos puede consistir bien en la falta de adaptación de las respuestas (**D**) o, por el contrario, en la disminución excesiva (depresión) de las mismas. (Tomada de (McEwen, 2007).

Atendiendo a su naturaleza u origen, los estímulos estresantes se pueden clasificar en las siguientes categorías:

- *Físicos*: frío, calor, radiación, ruido, vibración, etc.
- *Químicos*: medicamentos, contaminación, tabaco, etc.
- *Psicológicos*: emociones como la ansiedad, el miedo, la frustración, etc. y sensaciones como la de hambre o sueño.
- *Sociales*: desempleo, separaciones, fallecimientos, dominancia en animales, etc.
- *Metabólicos*: ejercicio físico, hipoglucemia, hemorragia, etc.
- Afectan a múltiples sistemas: restricción del movimiento, inmovilización, dolor, etc.

Es importante destacar, por otra parte, que ningún agente estresante afecta al organismo de un modo simple (**Tabla 1.3**). El frío, por ejemplo, a pesar de considerarse un estresor físico, también tiene efectos sobre el estado metabólico del organismo mediante la activación de la lipólisis y la termogénesis, y mediante la liberación de NA.

Tabla 1.3. Efectos físicos, químicos, psicológicos, sociales, cardiovasculares y metabólicos producidos por diferentes estresores (Myslivecek y Kvetnansky, 2006).

Categoría	Agente estresante	Efectos					
		Físico	Bioquímico	Psicológico	Social	Cardiovascular	Metabólico
Físico	Frío					✓	✓
	Calor		✓			✓	✓
	Radiación						✓
	Ruido			✓			
	Vibración					✓	
Químico	Hipoglucemia					✓	✓
	Estrés oxidativo	✓					✓
	Intoxicación	✓					✓
	Hipoxia					✓	
Psicológico	Restricción de comida		✓				
	Privación de sueño					✓	✓
	Estrés emocional				✓		
	Depresión				✓		
Social	Hacinamiento			✓			
	Aislamiento			✓			
	Ubicación dentro del territorio de un macho dominante	✓		✓			
Metabólico	Hemorragia	✓	✓			✓	
	Ejercicio físico	✓		✓			✓
	Ortostasis	✓					
	Sujeción vertical	✓					
Multisistémico	Inmovilización	✓		✓	✓	✓	✓
	Restricción movimiento	✓		✓	✓	✓	✓
	Dolor	✓	✓	✓			
	Privación de agua y comida	✓	✓	✓		✓	✓
	Cambio ritmo circadiano	✓		✓			
	Natación forzada	✓		✓		✓	✓

En contraposición al concepto original de Cannon de un sistema simpatoadrenal unitario, hoy se considera que los sistemas catecolaminérgicos periféricos pueden estar regulados diferencialmente por los distintos estresores y contribuyen de forma diferente a la respuesta de estrés. Así, numerosas evidencias indican que la activación del sistema simpatoeural está asociada con la reacción activa de la respuesta de estrés (huida), mientras que la activación del sistema simpatoadrenal estaría asociada a la reacción pasiva (paralización, miedo) (Goldstein y Kopin, 2008). En consecuencia, la liberación de A y NA son dependiente del tipo de estrés. Así, la A procedente de la médula adrenal se libera fundamentalmente en respuesta a la hipoglucemia, la inmovilización y el estrés psíquico, mientras que el dolor o el frío inducen preferentemente la liberación de NA por las terminaciones nerviosas simpáticas (Kvetnansky y col., 1998; Pacak y col., 1998). En la **Tabla**

1.4 se recogen los patrones de elevación de las concentraciones plasmáticas de CA, GC y ACTH producidos por varios estresores de amplia utilización en la investigación básica sobre el estrés.

Tabla 1.4. Respuesta hormonal a diferentes estresores. Se emplea una escala semicuantitativa para ilustrar el incremento de la concentración plasmática de las distintas hormonas de estrés en la rata. Nivel alto, +++; Nivel moderado, ++; Nivel bajo +; solo detectable \pm (Myslivec y Kvetnansky, 2006).

TIPO DE ESTRÉS	NA	A	ACTH	CORT
Inmovilización	+++	+++	+++	+++
Frío	+++	\pm	\pm	++
Hipoglucemia	+	+++	++	++
Hemorragia	\pm	\pm	+	+++
Dolor	+++	+	++	+++

1.6.1.3. Vías y mecanismos de la respuesta de estrés

Las respuestas de estrés se coordinan a nivel del SNC. A él accede información procedente del medio interno y/o externo tanto de forma directa (por ejemplo, neuronas hipotalámicas que actúan como glucostatos o termostatos) como mediante vías nerviosas aferentes constituidas por las fibras sensitivas del sistema nervioso periférico. Una vez procesada la información a nivel central, son las vías eferentes del mismo las que se encargan de iniciar la ejecución de la respuesta.

Según Palkovits y Brownstein (Palkovits y Brownstein, 1985), los estímulos que desencadenan esta respuesta pueden ser clasificados en tres grupos: a) estímulos somáticos y viscerales conducidos por fibras nerviosas sensitivas; b) estímulos generados en los órganos de los sentidos, y c) estímulos emocionales, originados y/o modulados por el sistema límbico.

1.6.1.3.1. Vías aferentes

La organización anatómica de las vías aferentes puede esquematizarse del modo siguiente: a) aferencias vehiculadas por los pares craneales (fundamentalmente el X par craneal o nervio vago), que alcanzan el tronco del encéfalo (núcleo del tracto solitario (NTS), área postrema, médula ventrolateral, núcleos del rafe, formación reticular, *locus coeruleus* y núcleo parabranchial) donde hacen sinapsis y, a través del tracto espinotalámico, remiten información a los núcleos del tálamo; b) aferencias procedentes del resto del organismo a través de la médula espinal. A su vez, existen dos rutas aferentes medulares principales: 1ª) la vía lemniscal, en la que las fibras de las neuronas sensitivas primarias se integran en los cordones posteriores ipsilaterales de la médula espinal para alcanzar los núcleos troncoencefálicos. Desde éstos, parte la segunda neurona que alcanza el tálamo

ventrobasal; y 2ª) la vía extralemniscal, en la que las fibras de las neuronas sensitivas primarias hacen sinapsis en las láminas I y II de las astas dorsales contralaterales de la médula espinal, donde se sitúa la segunda neurona que asciende por el fascículo espinotalámico hasta el tálamo posterior. Independientemente de la vía de acceso, desde los núcleos del tálamo parten proyecciones hasta la corteza cerebral, donde se encuentran los somas de la tercera neurona de la vía aferente.

La información nociceptiva visceral es transmitida fundamentalmente mediante fibras nerviosas incluidas en los nervios simpáticos y alcanza la médula espinal a través de los nervios espinales. Los somas de la primera neurona de la vía aferente (tanto visceral como somática) se localizan en los DRGs. La información no nociceptiva (distensión de vísceras huecas, PO₂, PCO₂, pH, glucemia, etc.) es transportada por fibras que viajan con los nervios parasimpáticos (fundamentalmente el nervio vago) y alcanza núcleos sensitivos (ganglio nodoso, ganglio petroso, ganglio del trigémino) situados en el tronco del encéfalo. Aproximadamente, el 90% de las fibras sensitivas son amielínicas.

1.6.1.3.2. Vías eferentes

El sistema eferente vehicula información desde los centros integradores del cerebro hacia la periferia. Consta de dos vías principales: la vía humoral, dependiente de la activación del eje HPA, y la vía neuronal, que desde el tronco del encéfalo y mediante las denominadas neuronas premotoras alcanza los somas de las neuronas preganglionares simpáticas situadas en el asta intermediolateral de la médula espinal. Debe señalarse que también desde el hipotálamo parten fibras descendentes que llegan, bien directamente (monosinápticamente) o mediante el establecimiento de sinapsis con neuronas catecolaminérgicas troncoencefálicas hasta las neuronas preganglionares de los segmentos torácicos de la médula espinal. Además de las neuronas catecolaminérgicas del tronco del encéfalo, las neuronas no catecolaminérgicas de la médula oblongada y las neuronas serotoninérgicas del rafe también alcanzan las neuronas preganglionares simpáticas. Todas estas neuronas son conocidas como neuronas premotoras simpáticas.

Las fibras preganglionares simpáticas abandonan la médula espinal por las raíces ventrales de los nervios espinales y las ramas comunicantes blancas (fibras mielínicas). La mayoría de estas fibras hace sinapsis en los ganglios simpáticos de las cadenas paravertebrales. En estos ganglios se sitúan los somas de las neuronas simpáticas postganglionares cuyos axones se unen a los nervios espinales a través de las ramas comunicantes grises (fibras amielínicas) para alcanzar sus destinos periféricos. En cambio, las fibras postganglionares que inervan las vísceras abdominales y pélvicas tienen sus cuerpos celulares en ganglios prevertebrales impares (celíaco, mesentérico superior e inferior y aortorrenal) situados en la cavidad abdominal. La única excepción a la organización bineuronal del sistema nervioso simpático concierne a la médula adrenal. La médula suprarrenal

recibe fibras preganglionares procedentes de los nervios esplácnicos, mayor y menor, y sus células cromafines pueden considerarse neuronas postganglionares modificadas.

1.6.1.3.3. Centros integradores

Entre las estructuras cerebrales donde se integra la información relacionada con el estrés cabe destacar el sistema límbico, el hipotálamo y la corteza temporal y prefrontal. El hipotálamo, y en particular el NPV, constituye el principal centro integrador de la respuesta autonómica. Desde el hipotálamo parten proyecciones hacia regiones troncoencefálicas como el núcleo parabrancial, el NTS o el *locus coeruleus*, donde se sitúan los somas de las neuronas premotoras que regulan la actividad de las divisiones simpática y parasimpática del SNA. Sin embargo, las neuronas hipotálamicas pueden actuar también como neuronas premotoras en virtud de conexiones directas con neuronas de los núcleos motor del vago y núcleo ambiguo y con neuronas de la columna intermediolateral de la médula espinal. El hipotálamo es capaz de coordinar la actividad del SNA con la del eje HPA y, al tiempo, controlar el resto de las funciones neuroendocrinas relacionadas con la hipófisis. Por otra parte, la estimulación eléctrica de estructuras límbicas como el septo, la amígdala o el hipocampo se asocia a la elevación de los niveles plasmáticos de CORT, mientras que la destrucción de ciertos núcleos hipotálamicos anula este efecto. Existen, por tanto, vías anatómicas que conectan las estructuras límbicas principales con el hipotálamo; así, la amígdala se relaciona directamente con el NPV por medio de la estría terminal. En consecuencia, el hipotálamo media buena parte de las interacciones entre el cerebro anterior (sistema límbico y neocórtex), el tronco del encéfalo y la hipófisis, lo que le permite coordinar la respuesta del organismo relacionada con la alimentación, la termorregulación, el balance hídrico, algunos ritmos circadianos, el impulso sexual o la motivación.

Anatómica y funcionalmente es posible distinguir dos regiones en el sistema límbico: a) el sistema límbico mesencefálico, en conexión con la sustancia reticular activadora ascendente, es el primero en recibir la información que en última instancia genera la respuesta de estrés; b) el sistema límbico prosencefálico, que es el responsable de evaluar la situación y elegir la respuesta más adecuada. Para ello cuenta, entre otras, con conexiones con el lóbulo temporal así como con aferencias monosinápticas desde los bancos de memoria, lo que le permite comparar la información almacenada con la correspondiente a los nuevos estímulos. Además, las conexiones con el lóbulo frontal le aportan patrones de comportamiento e integran la información sensitivo-motora.

Una vez integrada y evaluada la información, el organismo ejecuta una respuesta que, en su definición más clásica, es de lucha o huida (**Figura 1.29**). La respuesta elegida puede, no obstante, ser muy variable, si bien generalmente es similar a la llevada a cabo previamente en situaciones semejantes. Si la respuesta resulta adecuada, se produce la extinción del estado de alarma así como

de la respuesta de estrés. En caso contrario, la situación de alarma persiste, con el consiguiente ajuste de la respuesta. Eventualmente, el organismo puede mostrarse incapaz de manejar la situación, lo que puede conllevar la inhibición del comportamiento y un notable incremento del nivel de ansiedad.

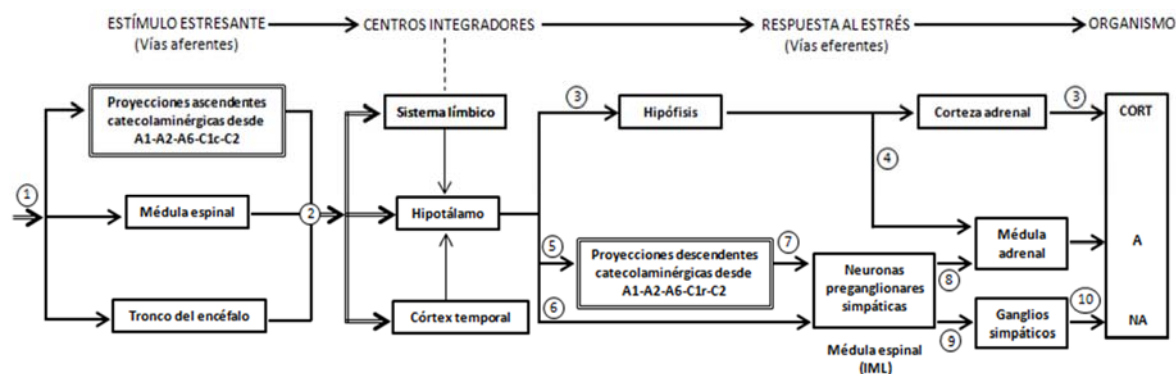


Figura 1.29. Diagrama de bloques de la organización central y periférica de la respuesta de estrés en la rata. 1, Estímulos estresantes visceros- y somato-sensitivos; 2, Rutas ascendentes no catecolaminérgicas, espinales y troncoencefálicas, y rutas catecolaminérgicas troncoencefálicas hacia los centros integradores: hipotálamo, sistema límbico y córtex cerebral; 3, Eje hipotálamo-hipófisis-corteza adrenal; 4, Acción de la ACTH sobre la síntesis de A por las células cromafines de la médula adrenal; 5, Proyecciones hipotalámicas hacia neuronas catecolaminérgicas descendentes del tronco cerebral; 6, 7, Proyecciones de las neuronas premotoras hasta las neuronas simpáticas preganglionares situadas en el asta intermedio lateral de la médula espinal; 8, Sistema simpatoadrenomedular; 9, Sistema simpatooneural; 10, Varicosidades de las terminaciones de las fibras nerviosas simpáticas postganglionares. CORT, corticoesterona; IML, asta intermediolateral de la médula espinal; A, adrenalina; NA, noradrenalina; A1, neuronas localizadas en la porción caudal de la médula ventrolateral; A2, neuronas localizadas a lo largo del núcleo del tracto solitario y en el núcleo dorsal motor del vago; A6, neuronas localizadas en el *locus coeruleus* y el área *subcoeruleus*; C1, neuronas localizadas en la médula ventrolateral desde el nivel del obex hasta el límite puente/médula (C1c, ascendentes caudales; C1r, descendentes rostrales); C2, neuronas localizadas en la médula dorsomedial (Kvetnansky y col., 2009).

1.6.1.3.4. Mecanismos efectores

Los principales sistemas efectores de la respuesta de estrés son el eje HPA y el SNA. Su activación conlleva el incremento de las concentraciones plasmáticas de los principales mediadores (A, NA, CRH, ACTH y GC) y se traduce en los efectos orgánicos característicos del SGA durante y tras la finalización de la exposición a los estímulos estresantes.

La activación de estos sistemas tiene lugar secuencialmente (**Figura 1.27**). La respuesta más rápida (en la escala de segundos) tras la exposición a un estímulo estresante depende de la activación del SNA y en ella participan tanto la división simpática como la parasimpática. Como consecuencia se produce la liberación de ACh y NA en las uniones neuroefectoras y de A en la circulación sanguínea. En la escala de tiempo de los minutos se materializa la activación del eje HPA. Es a nivel del NPV del hipotálamo donde se inicia la activación *en cascada* de este eje con la liberación a nivel hipofisario de la CRH y la VP (Antoni, 1986; Whitnall, 1993). Tanto la CRH como la VP tienen efectos sinérgicos sobre la liberación de ACTH hipofisaria (Gillies y col., 1982), por lo que se considera a la VP un amplificador de la respuesta de estrés. Tras su liberación, la hormona ACTH es

transportada por la circulación sistémica hasta la corteza de las glándulas adrenales donde las células de la zona fasciculada actúan como efectores primarios de la ACTH, llevando a cabo la síntesis y liberación de los GC (Ziegler y Herman, 2002). La respuesta del eje HPA regula la de otros órganos endocrinos, en particular la de la médula adrenal, y directa o indirectamente influye en una gran variedad de procesos fisiológicos, incluyendo la función cardiovascular, la respuesta inmune e inflamatoria y la función reproductiva.

Además, los GC modifican el metabolismo de los principios inmediatos al aumentar la proteólisis, la lipólisis y la gluconeogénesis, y disminuir la utilización de la glucosa por las células del músculo esquelético y del tejido adiposo; como consecuencia de estas acciones, los GC incrementan los niveles plasmáticos de glucosa, aminoácidos y triglicéridos.

Dado los intensos efectos catabólicos de los GC sobre el organismo, resulta crítico que la magnitud y la duración de la respuesta glucocorticoidea de estrés esté controlada y guarde la correcta proporcionalidad con la intensidad del estímulo estresante. El control se logra mediante un sistema de retroalimentación negativa, en virtud del cual los GC adrenales pueden inhibir la secreción de CRH y ACTH. Los GC pueden actuar en sus células diana a dos niveles: a) genómico y b) no genómico. En el primer caso, los GC se unen a receptores intracelulares de glucocorticoides (GR) y de mineralocorticoides (MR), que son factores de transcripción y, en consecuencia, alteran la síntesis de proteínas. Este tipo de efecto manifiesta un periodo de latencia mínimo de decenas de minutos a partir de la elevación de los niveles plasmáticos de GC. Las acciones no genómicas se deben a la activación de receptores de la membrana celular, lo que da lugar a respuestas rápidas (segundos) y breves. La señalización no genómica explicaría la rápida inhibición del eje HPA por retroalimentación negativa, si bien aún no se ha esclarecido si este mecanismo se relacionaría exclusivamente con receptores de membrana o también implicaría a receptores esteroideos intracelulares.

1.6.1.4. Estrés crónico: fenómenos adaptativos

Las modificaciones orgánicas en respuesta al estrés agudo son de naturaleza transitoria ya que tras un breve periodo de tiempo, que depende del carácter y la intensidad del estímulo estresante, la actividad de los sistemas efectores vuelve a su nivel basal. En cambio, los estímulos estresantes prolongados o repetidos pueden inducir la activación sostenida de los sistemas efectores. Además, si el estímulo estresante se mantiene durante días o semanas, puede alcanzarse la fase de agotamiento del SGA o, de acuerdo a concepciones más recientes, de adaptación.

El tálamo (núcleos medial y anterior) parece intervenir en el procesamiento de la información relacionada con el estrés crónico. Esta región recibe numerosas aferencias desde el subiculum ventral y la corteza prefrontal medial (Sesack y col., 1989; Hurley y col., 1991; Cullinan y col., 1993; Moga

y col., 1995; Li y Kirouac, 2008) por lo que actuaría, como intermediario entre las regiones cerebrales inhibitoras (hipocampo, corteza prefrontal medial y amígdala) y las excitadoras (hipotálamo dorsomedial, NTS y núcleo arcuato). La exposición crónica a estímulos estresantes induce una serie de fenómenos adaptativos en diversas regiones cerebrales involucradas en el control del eje HPA y de la respuesta autonómica al estrés. Así, en el estrés crónico por inmovilización se ha observado en el NPV del hipotálamo un incremento de los niveles de expresión de CRH y de VP (Herman y col., 1995; Makino y col., 1995), una disminución de los receptores de GC (Herman y col., 1995; Makino y col., 1995) y modificaciones en la expresión de subunidades de receptores como el de glutamato tipo NMDA o GABA (Cullinan, 2000; Ziegler y col., 2005). El estrés crónico por inmovilización induce también la retracción de las dendritas apicales y la reducción de su densidad en las células piramidales del hipocampo y del córtex prefrontal (Magarinos y McEwen, 1995; Radley y col., 2008). Por el contrario, en la amígdala basolateral se observa un incremento de las ramificaciones dendríticas. Así mismo, se han descrito cambios neuroquímicos en las vías neuronales que proyectan desde el sistema límbico al NPV, entre los que destaca el aumento en la expresión de la descarboxilasa del ácido glutámico con el consiguiente incremento de los niveles de GABA en el hipotálamo.

Con independencia de estas modificaciones, desde el punto de vista fenomenológico merecen destacarse dos procesos en la respuesta de estrés crónico: la sensibilización y la habituación.

La sensibilización consiste en el aumento de la respuesta del eje HPA y del SNA ante la exposición repetida o prolongada a estímulos idénticos (sensibilización homotípica) o diferentes (sensibilización heterotípica) (Akana y col., 1992; Ulrich-Lai y col., 2007). La exposición crónica al frío facilita (aumenta la relación de proporcionalidad entre la intensidad del estímulo y la respuesta) la liberación de NA en el córtex prefrontal y el incremento de la frecuencia de disparo de las neuronas noradrenérgicas del *locus coeruleus* tras la exposición a un estímulo estresante distinto (Nisenbaum y Abercrombie, 1993; Holmes y col., 1995; Mana y Grace, 1997; Jedema y col., 2001). Así mismo, la exposición prolongada al frío aumenta la sensibilidad del *locus coeruleus* a la CRH (Jedema y col., 2001) y se asocia a un incremento en la expresión de la TH, la enzima limitante en la biosíntesis de NA (Holmes y col., 1995; Watanabe y col., 1995). Todo ello no es óbice para que en estas circunstancias se observe una disminución de los depósitos centrales y periféricos de CAs. El *locus coeruleus* carece de proyecciones sobre el NPV (Cunningham y Sawchenko, 1988), lo que sugiere que la regulación del eje HPA requiere la participación tanto de áreas superiores (hipocampo, corteza prefrontal medial y amígdala) como inferiores (médula ventrolateral troncoencefálica y médula espinal). Esta noción se vería confirmada por el hecho de que la lesión del NPV posterior del tálamo inhibe la facilitación de la respuesta del eje HPA en modelos de estrés crónico (Bhatnagar y Dallman, 1998).

Los mecanismos implicados a nivel periférico en el proceso de sensibilización durante el estrés crónico son menos conocidos. En relación con el sistema nervioso simpático se ha descrito el aumento de la expresión del ARNm de la TH y PNMT con el consiguiente incremento en la actividad biosintética de CAs (Micutkova y col., 2003; Kvetnansky y col., 2004; Kubovcakova y col., 2006; Kvetnansky y col., 2006). Por otra parte, nuestro grupo ha contribuido a poner de manifiesto cambios en la transmisión sináptica, acoplamiento intercelular y actividad eléctrica de las células cromafines de la médula adrenal de ratas expuestas a un protocolo experimental de estrés crónico por frío que, como se describe en epígrafes posteriores, reflejan cambios en la dotación de canales iónicos de la membrana de dichas células (Colomer y col., 2010; Colomer y col., 2012). Es posible que modificaciones similares puedan ocurrir también en los ganglios simpáticos.

El descenso en la magnitud de la respuesta durante la exposición a un estímulo estresante o con cada exposición a estímulos repetidos (idénticos o diferentes) es característico del fenómeno de habituación (Akana y col., 1992; Dhabhar y col., 1997). En este proceso parecen estar involucrados los MR, ya que los antagonistas de los mismos bloquean la habituación, inducida por la corticoesterona, de la respuesta a estresores como la inmovilización (Cole y col., 2000).

La habituación de la respuesta del SNA es muy dependiente del modelo de estrés utilizado. Así, el estrés social apenas provoca en el ratón habituación de la respuesta autonómica medida en términos de frecuencia y gasto cardíacos (Sgoifo y col., 1999; Costoli y col., 2004). A este nivel, la habituación suele implicar una modificación del equilibrio simpático-vagal, ya sea por aumento del tono simpático o por reducción del tono vagal, lo que conlleva, en ratas sometidas a un modelo de estrés por chorro de aire, a un aumento de la frecuencia cardíaca y una disminución de la variabilidad de la frecuencia cardíaca (Grippe y col., 2002). Por otra parte, el estrés crónico por vibración se asocia a la disminución de la variabilidad de la presión sanguínea en ratones (Farah y col., 2004). Al igual que en el proceso de facilitación, los mecanismos celulares implicados que participan en la habituación del SNA no son bien conocidos.

1.6.1.5. El estrés por frío

La exposición al frío desencadena una reacción del organismo que conlleva modificaciones fisiológicas y comportamentales orientadas a mantener la estabilidad térmica (Satinoff, 1978). Cabe destacar que existen dos tipos de estímulos térmicos: externos e internos. Los cambios de la temperatura ambiental activan termorreceptores localizados en la piel, que mediante las fibras sensitivas de los nervios espinales y craneales activan, respectivamente, neuronas del asta dorsal de la médula espinal y del bulbo raquídeo. En cambio, las variaciones térmicas detectadas en el interior corporal pueden ser transmitidas bien por fibras viscerosensoriales hasta el NTS en el bulbo raquídeo o mediante rutas humorales influir sobre otras neuronas termosensitivas.

Toda la información relacionada con la temperatura corporal es integrada en el núcleo preóptico del hipotálamo, que actúa como el principal centro termorregulador del cerebro (Lipton y col., 1970; Kanosue y col., 1990; Scammell y col., 1993; Kiyohara y col., 1995; Miyata y col., 1995; Zhang y col., 1997; Patronas y col., 1998). De este núcleo parten proyecciones hacia el tronco del encéfalo y el NPV del hipotálamo, con la consiguiente activación del SNA y del eje HPA. La respuesta termorreguladora del organismo implica ajustes orientados a la conservación del calor, dependientes de modificaciones en el flujo sanguíneo cutáneo y la sudoración, como de la producción del mismo, relacionados con la termogénesis. Así, la exposición al frío ambiental se traduce en vasoconstricción cutánea, piloerección, activación del tejido adiposo marrón, y cambios a nivel metabólico, postural y comportamental (Kanosue y col., 1998). Es necesario destacar que, a diferencia de otros estímulos estresantes, el frío activa relativamente poco el sistema límbico y el sistema catecolaminérgico central. La exposición al frío durante 1 h provoca un débil aumento en la expresión de CRH en el NPV y de pro-opiomelanocortina (POMC) en la adenohipófisis (Harbuz y Lightman, 1989). El estrés por frío tanto agudo como crónico desencadena un notable incremento de la expresión de la TRH en el hipotálamo y un aumento en los niveles plasmáticos de tirotropina (TSH) (Ishikawa y col., 1984; Lin y col., 1989; Zoeller y col., 1990; Rondeel y col., 1991; Fukuhara y col., 1996). Además, los niveles de serotonina extracelular en el NPV están incrementados de forma significativa durante el estrés por frío (Ohtani y col., 1999), sugiriendo que las fibras serotoninérgicas que terminan en el NPV influirían en la síntesis de TRH. El frío produce un patrón de respuesta hormonal claramente diferenciable del de otros estímulos estresantes como el dolor, la inmovilización o la hemorragia (**Tabla 1.4**) (Palkovits y col., 1995; Myslivecek y Kvetnansky, 2006), consistente en un marcado incremento de los niveles plasmáticos de NA y un aumento moderado de los niveles de A, ACTH y corticosterona. Sin embargo, cuando la respuesta termorreguladora fracasa en su intento de mantener la temperatura corporal (hipotermia) el organismo reacciona ante lo que constituye una amenaza metabólica mediante el incremento de la liberación de A y corticosterona por la glándula adrenal (Frank y col., 1995; Goldstein y Kopin, 2008). El aumento de la A circulante se justifica por su capacidad para aumentar la tasa metabólica y, en consecuencia, la producción de calor (Staten y col., 1987). Los efectos del frío sobre el contenido de CAs de la médula adrenal son congruentes con los resultados de las determinaciones de CAs circulantes. En experimentos realizados en ratas, se observa un incremento de la concentración plasmática de NA y una disminución selectiva del contenido adrenomedular de la misma, que alcanza significación estadística a las 18 h de ser expuestas a una temperatura ambiental de 4°C (Vollmer y col., 1995). Sin embargo, en animales sometidos durante 5 días a ese paradigma experimental, se constata reducciones similares ($\approx 25\text{-}35\%$) del contenido adrenomedular de A y NA acompañados de los correspondientes incrementos en los niveles plasmáticos ($\approx 40\%$) de ambas CAs (Colomer y col., 2008b).

El aumento de la liberación de CAs inducido por el frío se asocia también a un aumento de su biosíntesis (Kvetnansky y col., 1971). Así, la exposición aguda a ese estímulo (4°C, 1 h) induce un aumento de los niveles de ARNm (incremento del 71% a las 3-6 h) y de la proteína (incremento del 300% a las 48-72 h) de la TH (Baruchin y col., 1990). Sin embargo, tras exposiciones prolongadas (varias semanas), tanto los niveles del ARNm como la actividad enzimática de la TH vuelven a niveles similares a los observados en la médula adrenal de animales no estresados (habitución; (Kvetnansky y col., 2002). Otra modificación observada en la médula adrenal es el aumento en los niveles del ARNm de la PNMT (Tai y col., 2002), enzima clave para la síntesis de A, el cual obedece tanto a mecanismos neuronales (relacionados con la actividad sináptica en la unión nervio esplácnico-célula cromafín) como no neuronales (posiblemente, en relación con la existencia de mediadores como la angiotensina II, cuyos niveles plasmáticos aumentan en situaciones de estrés), como demuestra el hecho de que la denervación de la glándula adrenal no suprime ese incremento (Baruchin y col., 1993).

1.6.1.6. Plasticidad de la médula adrenal durante el estrés

La actividad eléctrica de las células cromafines y, consiguientemente, la secreción de CAs por la médula adrenal se encuentran sometidas a un doble control: i) sináptico, por las terminaciones del nervio esplácnico que actúa sobre nAChRs y mAChRs situados en la membrana de las células cromafines (Douglas, 1968; Wakade, 1981); ii) no sináptico, por uniones en hendidura entre las células cromafines (Martin y col., 2001; Colomer y col., 2009). Estas dos formas de comunicación intercelular están funcionalmente relacionadas, ya que la neurotransmisión colinérgica ejerce habitualmente un control tónico inhibitor sobre las uniones en hendidura (Martin y col., 2003). Por ello, el papel de las uniones en hendidura es particularmente relevante en situaciones en las que el control neural de la liberación de CAs no es plenamente eficaz, como ocurre en los recién nacidos (la innervación preganglionar adquiere competencia funcional al cabo de la primera semana de vida postnatal) y en glándulas adrenales denervadas por procedimientos quirúrgicos, traumáticos o farmacológicos (mediante la administración de antagonistas nicotínicos) (Martin y col., 2003; Martin y col., 2005a; Martin y col., 2005b).

Además de los efectos bien descritos sobre la expresión de genes y enzimas implicadas en la biosíntesis de las CAs (Baruchin y col., 1990; Sabban y Kvetnansky, 2001), el estrés induce también a una remodelación anatómo-funcional de la comunicación intercelular y de la transmisión sináptica colinérgica en la medula adrenal de la rata adulta. Estos acontecimientos son particularmente obvios en respuesta al estrés crónico por frío (5 días a 4°C), situación en la que la demanda de CAs del organismo está incrementada de forma sostenida (Kvetnansky y col., 1978)..

1.6.1.6.1. Modificaciones en la en la sinapsis esplacno-cromafín

La transmisión sináptica entre las terminaciones del nervio esplácnico y las células cromafines está aumentada en condiciones de estrés por frío (Guerineau y Desarmenien, 2010), lo que se debe a una mayor densidad de fibras nerviosas que establecen sinapsis con las células cromafines, y se manifiesta por un mayor número de células que presentan sEPSCs (22% en rodajas de la glándula adrenal de animales estresados vs. 6% en glándulas procedentes de animales control) así como por una mayor frecuencia de éstos en cada célula ($0,12 \pm 0,01$ Hz en animales estresados vs. $0,04 \pm 0,01$ Hz en animales control) (Colomer y col., 2008b).

Cabe destacar que el estrés por frío también modifica el patrón de expresión de los nAChRs en la médula adrenal (Colomer y col., 2008a). Mediante experimentos de RT-PCR se ha determinado un aumento (≈ 5 veces) de la expresión del ARNm que codifica la subunidad $\alpha 9$ de los nAChRs (Colomer y col., 2010), sin modificación significativa de la transcripción de la $\alpha 3$ y $\alpha 7$. Así mismo, experimentos de inmunotransferencia confirman el aumento significativo (1,8 veces) de la expresión de nAChRs $\alpha 9^*$. Estos resultados contrastan con la disminución del nAChR $\alpha 7$ observada en condiciones de hipoxia crónica (Ducsay y col., 2007), y sugieren que la regulación de los nAChRs de las células cromafines es específica del estresor, permitiendo a las células cromafines adaptar su respuesta a las necesidades propias de cada situación estresante.

Los cambios observados a nivel molecular tienen un correlato farmacológico. Así, en cortes de la glándula adrenal de ratas estresadas, la α - RgIA, un bloqueante selectivo de los nAChRs $\alpha 9^*$, reduce en un 75% las corrientes inducidas por la administración exógena de ACh, duplicando su eficacia respecto a la que presenta en animales control. Estos resultados son especulares de los que se obtienen con hexametonio (200 μ M), que inhibe un 44,6% las corrientes inducidas por ACh en ratas estresadas y un 76,2% en sus controles. El conjunto de las evidencias referidas indica una contribución dominante de los nAChR $\alpha 9^*$ en las respuestas nicotínicas de las células cromafines de la médula adrenal de ratas sometidas a un protocolo de estrés por frío (Colomer y col., 2010), en claro contraste con el papel dominante que juegan los nAChRs $\alpha 3$ en condiciones control (Criado y col., 1992; Campos-Caro y col., 1997; Sala y col., 2008). Mediante microscopía confocal se ha establecido la colocalización de los nAChRs $\alpha 9^*$ y la sinaptofisina (Chauvet y col., 2003), indicativa de una localización sináptica preferencial de este nAChR (Colomer y col., 2010).

1.6.1.6.2. Modificaciones en la comunicación intercelular mediada por uniones en hendidura

Las uniones en hendidura son elementos especializados de la membrana plasmática formados por oligómeros proteicos capaces de formar canales intercelulares que permiten el intercambio de metabolitos, iones, segundos mensajeros y, en general, de cualquier tipo de molécula con tamaño menor de 1.000 Da. Además, las uniones en hendidura posibilitan el acoplamiento eléctrico y, en

consecuencia, la propagación de potenciales de acción entre células vecinas. Las uniones en hendidura están constituidas por conexinas (Unwin, 1987; Sáez y col., 2003; Mehta, 2007), cuya expresión tanto en la porción cortical (zona fasciculada y zona reticular) como medular de la glándula adrenal de muy diversas especies de mamíferos (ratón, cobaya, hámster, conejo, rata y hombre) ha sido ampliamente documentada (Murray y Pharrams, 1997). Hasta el momento se han identificado unos 20 genes codificantes de estas proteínas (Mehta, 2007), pero únicamente se ha detectado la presencia de seis de ellas (Cx26, Cx29 –en las células sustentaculares y en las células que rodean las terminaciones del nervio esplácnico–, Cx32, Cx36, Cx43 y Cx50 –en las células cromafines) en la médula adrenal. Hay que señalar que el porcentaje de células cromafines funcionalmente conectadas y el tipo de Cx implicada en la formación de las uniones en hendidura es especie- y sexo-dependiente y también difiere en función del estado fisiológico de los animales (normal o estresado). Así, la Cx43 tiene mayor expresión en rata, ratón, cobaya y hombre (Meda y col., 1993; Murray y Pharrams, 1997), mientras que el porcentaje de células interconectadas es generalmente más elevado en la médula adrenal de las hembras y de animales estresados (véase más adelante).

El registro de los flujos de corriente entre parejas de células cromafines de rata adyacentes ha revelado la existencia de dos poblaciones de células en función del nivel de acoplamiento: i) débilmente acopladas, que presentan conductancias de unión –*junctional conductance*–, inferiores a 1 nS; ii) fuertemente acopladas, que presentan conductancias superiores a 1 nS. El porcentaje de células fuertemente acopladas alcanza el 80% en neonatos y disminuye hasta el 20-25% durante el desarrollo postnatal (Martin y col., 2001; Martin y col., 2005a). Análogamente, en animales estresados por frío (4 °C durante 5 días) o inmovilización, se produce una modificación en el grado de acoplamiento, incrementándose hasta el 50% el porcentaje de células que están fuertemente acopladas. Este aumento estaría relacionado con una mayor expresión fundamentalmente de la Cx43. (Colomer y col., 2008b) (**Figura 1.30**).

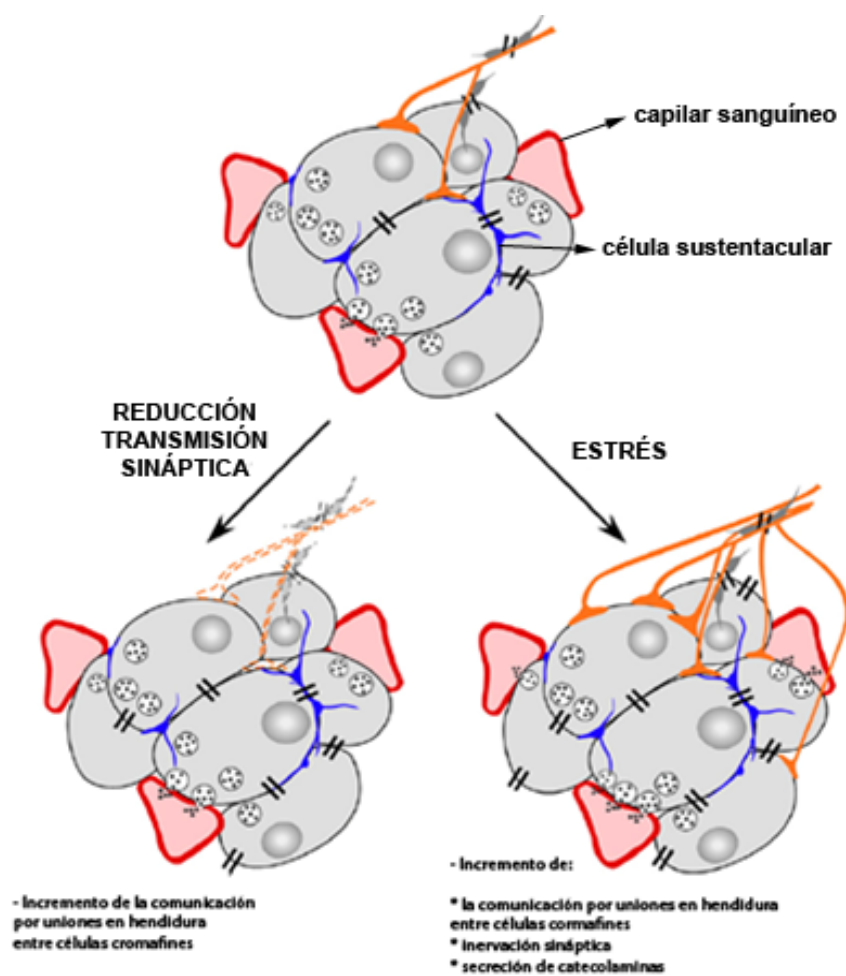


Figura 1.30. Plasticidad de la comunicación intercelular en la médula adrenal. En el panel superior se esquematiza el control sináptico y no sináptico (por uniones en hendidura) de la secreción de CAs por las células cromafines de la médula adrenal de la rata adulta. En el panel inferior se muestran dos situaciones (reducción de la transmisión sináptica y estrés con hiperinnervación de las células cromafines) asociadas al incremento del acoplamiento intercelular mediado por uniones en hendidura (Tomada de Colomer y col., 2011).

El mecanismo subyacente a la regulación al alza de las uniones en hendidura no está esclarecido, aunque se postula que podrían intervenir: i) mediadores no colinérgicos (PACAP) coliberados con la ACh por las terminaciones nerviosas de las fibras del nervio esplácnico (Kuri y col., 2009; Hill y col., 2012), y/o ii) otras sustancias (ATP, opioides, cromograninas, etc.) que se originen desde las células cromafines (Murray y col., 2003; Murray y col., 2009).

Colomer (Colomer y col., 2009) han propuesto que la comunicación a través de uniones en hendidura puede resultar tanto una acción facilitadora como inhibidora de la secreción de CAs, dependiendo de la frecuencia de descarga del nervio esplácnico y de la robustez del acoplamiento eléctrico mediado por las uniones en hendidura. En el caso de un acoplamiento muy robusto asociado a una elevada frecuencia de disparo, la comunicación por uniones en hendidura podría contrarrestar los efectos de la actividad sináptica al actuar como un filtro (por el aumento de la capacitancia y la disminución de la resistencia de las membranas celulares) sobre el cambio en el potencial de membrana producido por las corrientes sinápticas (De Vries y Sherman, 2000; Guerineau y

Desarmenien, 2010). Ello serviría para impedir una liberación masiva de CAs potencialmente peligrosa para el organismo (**Figura 1.31**). Por el contrario, un incremento del acoplamiento intercelular asociado a una elevada frecuencia de descarga del nervio esplácnico que produzca la desensibilización de los nAChRs de las células cromafines o asociado a una reducción de la actividad sináptica de origen central posibilitaría mantener una elevada actividad secretora al permitir la propagación de los potenciales de acción entre células vecinas.

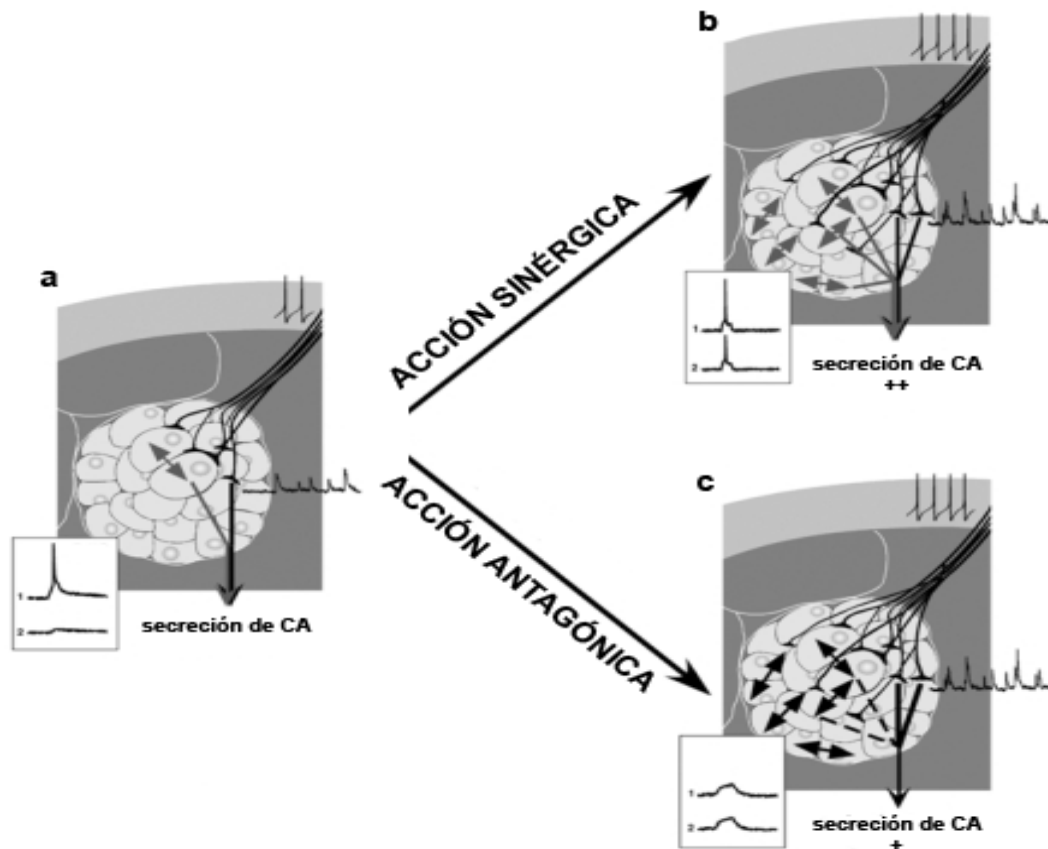


Figura 1.31. Efecto de la comunicación intercelular a través de uniones en hendidura sobre la secreción de CAs por la médula adrenal. Las uniones en hendidura podrían ejercer acciones opuestas sobre la generación de señales eléctricas y la secreción de CAs por las células cromafines. El grado de comunicación intercelular está ilustrado mediante flechas de doble punta y un recuadro en donde se muestra la señal eléctrica (potencial de membrana) en una célula estimulada (1) y una célula adyacente no estimulada (2). En condiciones basales cuando la demanda de CAs y la frecuencia de descarga del nervio esplácnico son bajas, una moderada comunicación intercelular entre las células cromafines podría contribuir a la liberación de CA (**a**). En situaciones de estrés, cuando la frecuencia de disparo del nervio esplácnico aumenta, un incremento de las uniones en hendidura entre las células cromafines actuaría sinérgicamente con la transmisión sináptica para facilitar la secreción de CAs (**b**). Sin embargo, un incremento excesivo de la comunicación intercelular puede conducir a una disminución de la resistencia de la membrana de las células cromafines con aumento de su capacitancia, lo que comportaría una reducción de la excitabilidad celular en respuesta a la actividad sináptica y, consiguientemente, una menor secreción de CAs (**c**) (Tomada de (Colomer y col., 2009).

1.6.1.6.3. Modificaciones de los canales iónicos de la membrana de las células cromafines

Al igual que ocurre con los nAChRs y las uniones en hendidura, la actividad de los canales iónicos dependientes de voltaje de las células cromafines de la médula adrenal se ve modificada por muy diversos estresores (Carbone y col., 2006). En la respuesta de estrés parece jugar un papel destacado el aumento de la actividad y expresión de los canales de Ca^{2+} de tipo T. Sus consecuencias serían las siguientes: i) descenso del umbral de disparo de potenciales de acción (Novara, 2004); ii) incremento de la cantidad de CAs segretadas a potenciales de membrana negativos (-30, -40 mV) (Giancippoli y col., 2006; Carabelli y col., 2007b); iii) movilización del contingente de *vesículas listas para ser liberadas (release-ready vesicles)* (Carabelli y col., 2007a). La sobreexpresión de los canales de Ca^{2+} tipo T podría ser, por tanto, la responsable del aumento de la excitabilidad que se observa en las células cromafines de ratas estresadas por frío, de manera que la mayoría de las células disparan potenciales de acción espontáneos al potencial de reposo (82,6% vs. 27,5%) y lo hacen a frecuencias significativamente superiores a las que se observan en condiciones control ($4,42 \pm 0,16$ Hz vs. $2,85 \pm 0,11$ Hz).

Las rutas de señalización implicadas en el aumento de actividad de los canales de tipo T son muy diversas, estando mediadas por diferentes mensajeros intracelulares y factores de transcripción (Guerineau y col., 2012). Algunas operan rápidamente (minutos), como la estimulación simpática de alta frecuencia que desencadena la liberación de PACAP, iniciándose así una cascada de señalización que desemboca en la activación de la PKC, con la consiguiente fosforilación e incremento de la activación del intercambiador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. Ello comporta una pequeña despolarización de la membrana, pero lo suficientemente importante para activar los canales de Ca^{2+} tipo T (Kuri y col., 2009; Hill y col., 2011). Por otra parte, la mayoría de vías de señalización operarían de manera más lenta, requiriendo del transcurso de días para su completo desarrollo. Es el caso del aumento de la transcripción del gen *CACNA1H*, que codifica para el canal de Ca^{2+} tipo T y que se observa en situaciones de hipoxia, la estimulación $\beta 1$ -adrenérgica, o la administración de VIP, aldosterona y ACTH (Novara y col., 2004; Giancippoli y col., 2006; Carabelli y col., 2007a; Carabelli y col., 2007b; Souvannakitti y col., 2010).

Otro tipo de canal iónico cuya actividad se ve modificada en situaciones de estrés es el canal BK (Xie y McCobb, 1998; Lovell y McCobb, 2001). La activación del eje HPA y la consiguiente liberación de ACTH estimulan la síntesis de GC, que a su vez favorecen el procesamiento alternativo del gen *Slo*, codificante de la subunidad α del canal BK. Este procesamiento consiste en la incorporación del exón STREX, formado por 174 pares de bases correspondientes al extremo C-terminal de la proteína del canal (Xie y McCobb, 1998; Lovell y McCobb, 2001).

Los canales BK que contienen la región STREX ven modificadas sus propiedades de la siguiente manera: i) se activan a potenciales 20 mV más negativos, y ii) la constante de tiempo de su deactivación es más lenta (2,31 ms). Estas características determinan una mayor activación de los

canales BK durante los potenciales de acción y, en consecuencia, la existencia de AHPs de mayor amplitud y duración. Por ello, las células cromafines que presenten una mayor expresión de esta isoforma del canal BK poseen una mayor capacidad para la descarga sostenida de potenciales de acción (Xie y McCobb, 1998). Esta capacidad se pone de manifiesto al comparar la duración de los trenes de potenciales de acción inducidos por la inyección de corriente en células cromafines de ratas hipofisectomizadas (sus canales BK carecen del exón *STREX*) y en células cromafines de animales control (**Figura 1.32**).

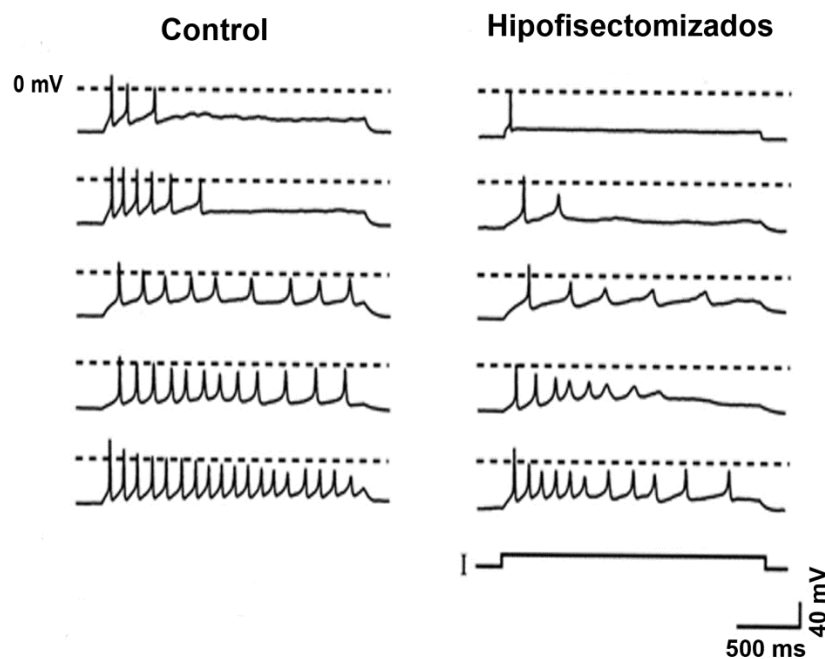


Figura 1.32. Registros de trenes de potenciales de acción generados por la inyección de corriente en células cromafines procedentes de ratas control (panel izquierdo) y en células cromafines de animales hipofisectomizados (panel derecho). Para cada condición se muestran los registros obtenidos en varias células distintas. En cada célula se inyectó corriente con intensidad supraumbral (Tomada de (Lovell y McCobb, 2001)).

II. PLANTEAMIENTOS Y OBJETIVOS

Las células cromafines de la médula adrenal son bien conocidas por su participación en la clásica respuesta de *lucha o huida* frente a los estímulos estresantes mediante la liberación de CAs al torrente sanguíneo. La activación de los nAChRs de la membrana de las células cromafines constituye el primer eslabón de la cadena de procesos que bajo la denominación de acoplamiento excitación-secreción traduce la liberación de ACh por las terminaciones del nervio esplácnico en la exocitosis de las CAs. Si bien se ha considerado que el nAChR predominante en las células cromafines de la rata es el de tipo *ganglionar*, formado por las subunidades $\alpha 3$ y $\beta 4$ o $\beta 2$ (Yokotani y col., 2002; Di Angelantonio y col., 2003; Pérez-Álvarez y col., 2012), los resultados de diversos grupos de investigación indican que no sería responsable de más del 50% de la corriente nicotínica de estas células. Por ello, el descubrimiento de un nuevo tipo de nAChR formado por las subunidades $\alpha 9$ y $\alpha 10$ en las células del epitelio sensitivo del sistema auditivo motivó su búsqueda y hallazgo en las células cromafines de la rata (Solís-Garrido, 2006; Colomer y col., 2010). El hecho de que el nAChR $\alpha 9^*$ de las células cromafines incremente su expresión en un modelo de estrés crónico por frío y sus peculiares características biofísicas –elevada permeabilidad al Ca^{2+} – y farmacológicas –sensibilidad a agonistas muscarínicos como la Oxo-M y antagonismo por Nic– posibilitan que ejerza una función inhibidora de la actividad eléctrica celular, única entre los nAChRs, al tiempo que constituya una diana con elevado potencial para una intervención farmacológica selectiva en distintas patologías asociadas al estrés.

Por otra parte, la contribución de otros nAChRs, como los formados por la subunidad $\alpha 7$, a la corriente nicotínica y a la respuesta secretora de CAs en las células cromafines no sólo es objeto de controversia en función de los datos discrepantes aparecidos en la literatura (López y col., 1998; Mousavi y col., 2001; Di Angelantonio y col., 2003; Martin y col., 2003), sino que también debe ser reevaluada mediante el uso de nuevas herramientas farmacológicas que permitan distinguir entre los nAChRs $\alpha 7$ y los nAChRs $\alpha 9^*$ y $\alpha 10^*$.

Por todo ello, en el presente trabajo nos planteamos los siguientes objetivos:

- 1º. Abordar en profundidad el estudio de la selectividad farmacológica de la α -RgIA, una toxina con pretendida especificidad para bloquear los nAChRs $\alpha 9^*$ y $\alpha 10^*$.
- 2º. Caracterizar farmacológicamente los nAChRs de la membrana de las células cromafines de rata en condiciones basales y en un modelo de estrés crónico por frío.
- 3º. Estudiar el significado funcional de la contribución de los nAChRs $\alpha 9^*$ y $\alpha 10^*$ a las respuestas sinápticas inducidas por la estimulación eléctrica de las terminaciones del nervio esplácnico.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIALES Y EQUIPOS

3.1.1. Material Biológico

Se han utilizado cultivos primarios (1 a 4 días) de células cromafines de la médula adrenal y de neuronas DRG de ratas *Sprague Dawley* (SD) de ambos sexos y edades comprendidas entre las seis y ocho semanas (200-300 g) procedentes del animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid (Número de Registro ES-28079-0000097 de la Comunidad Autónoma de Madrid). Las glándulas adrenales empleadas en las preparaciones de cortes de tejido fresco provinieron de ratas SD de ambos sexos con edades comprendidas entre las seis y doce semanas.

Así mismo, se utilizaron cortes de la glándula adrenal de ratones CBa CaJ y CBa CaJ “*knock-out*” para la subunidad $\alpha 9$ de los nAChRs ($\alpha 9$ KO) de ambos sexos y edades comprendidas entre los dos y seis meses, criados en el animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid. Las dos primeras parejas reproductoras fueron proporcionadas por la Dra. Ana Belén Elgoyhen (Universidad de Buenos Aires). En los animales $\alpha 9$ KO se sustituyó el exón 4, que contiene la secuencia que codifica el sitio de unión a ligando, por el gen de resistencia a la neomicina (**Figura 3.6**). El genotipado de los ratones se llevó a cabo mediante técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) empleando dos parejas cebadores: la primera (L9T5' y L9T3') da lugar a una banda de 480 pares de bases (pb), característica de los animales $\alpha 9$ KO, y la segunda (Kneo3 y Kneo4) origina una banda de 383 pb, característica de los ratones control (Vetter, Katz et al. 2007) (**Figura 3.1**).

Todos los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo a lo establecido en el Real Decreto 52/2013 de protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos (Boletín Oficial del Estado del 1 de Febrero de 2013, Número 34, Sección I, páginas 11370 a 11421). Por otra parte, el proyecto en el que se basa el presente trabajo fue aprobado por el Comité de Ética de la Experimentación Animal de la Universidad Complutense de Madrid.

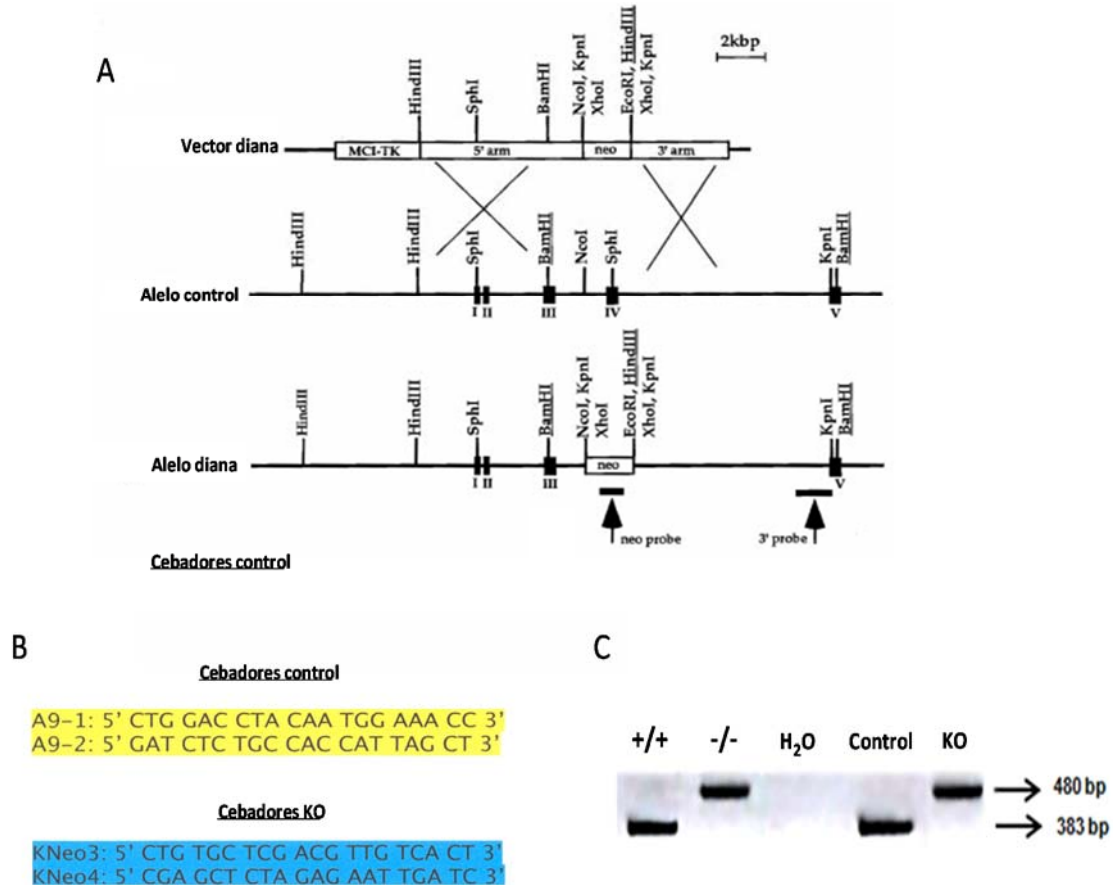


Figura 3.1. Herramientas empleadas para la generación de los ratones $\alpha 9$ KO de la cepa CBA CaJ. **A.** Se muestran las estructuras genéticas y el mapa de restricción utilizados para la construcción del alelo $\alpha 9$ -objetivo, así como del alelo control y el alelo recombinante. Las cajas negras representan los exones del gen $\alpha 9$. El exón 4 del alelo control fue reemplazado por el gen de resistencia a la neomicina (*neo*), mientras que el gen de la timidina quinasa del herpes virus simple (MC1-TK) se ligó al extremo 5' del vector diana para posibilitar la selección negativa. Las localizaciones del flanco 3' y del *cassette* de la neomicina aparecen indicadas (prueba 3' y prueba *neo*, respectivamente), y los sitios de restricción subrayados denotan las posiciones utilizados para el genotipado de los animales. **B.** Cebadores utilizados en la técnica de PCR. **C.** Gel de agarosa en donde se observan bandas de diferentes peso molecular correspondiente a ratones +/+ (383 pb); control y ratones -/- (480 pb) para el gen $\alpha 9$ completo.

3.1.2. Material fungible /cultivos celulares, registros electrofisiológicos y determinaciones de catecolaminas)

- Cámara de recuento celular de Neubauer (Marienfeld, Alemania)
- Cera dental (Cavex, Holanda)
- Cubreobjetos de 10 mm de diámetro (Menzel GMBH & Co, Alemania)
- Electrodo de estimulación TST33A10 (WPI, Inc., EEUU)
- Filamentos de plata y “*pellets*” de plata clorada (In Vivo Metric, EEUU)
- Filtros celulares de 100 μ m (BD Biosciences, EEUU)
- Filtros de 0,22 μ m Millex-Gs (Millespore Ibérica, España)

- Tubos capilares de borosilicato Kimble Chase (Gerresheimer, Alemania)
- Hojas de bisturí (Braun, Alemania)
- Jeringas estériles (BD Biosciences, EEUU)
- Microtubo (Eppendorf, Alemania)
- Pipetas estériles (Sterilin, Reino Unido)
- Pipetas Pasteur de plástico (Roll, Italy)
- Pipetas Pasteur de vidrio (Normax, Alemania)
- Placas Petri de 35 mm de diámetro (Iwaki Brand Scitech Div., Japón)
- Tubos de polietileno (BD Biosciences, EEUU)
- Tubos de centrifuga (Sterilin, Reino Unido)

3.1.3. Equipos

3.1.3.1. Instrumentación general

- Agitador magnético SBS A-32 (SBS Labscience, España)
- Autoclave (JP Selecta, España)
- Balanza (Mettler, España)
- Baño termostatzado (JP Selecta, España)
- Centrífuga Universal 32R (Hettich, Alemania)
- Congelador -70 °C HS 3686 (Hettich, Alemania)
- Equipo de purificación de agua (Merck Millipore, Alemania)
- Osmómetro VAPRO 5520 (Wescor, EEUU)
- pHmetro Basic 20+ (Crison, España)
- Pipetas automáticas (Eppendorf, Alemania)
- Sonicador Sonics Material Vibracell (Damburi, EEUU)
- 2x Nevera T1414 Comfort (Liebherr, Suiza)

3.1.3.2. Cultivos celulares (células cromafines y neuronas del ganglio de la raíz dorsal) y cortes de la glándula adrenal de rata y de ratón

- Bala de carbógeno (Air Liquide, España)
- Bala de CO₂ (Air Liquide, España)
- Campana de flujo laminar Hera Safe (Heraeus, Alemania)
- Incubador Hera Cell (Heraeus, Alemania)
- Mechero electrónico (Gasprofi, EEUU)
- Microscopio DM IL (Leica Microsystems, Alemania)

- Lámpara de luz fría FO-150 (Chiu Technical Corporation, EEUU)
- Lupa SZ40 (Olympus, Japón)
- Vibratomo Integraslice 7550 MM (Campden Instruments, Reino Unido) (**Figura 3.2**)

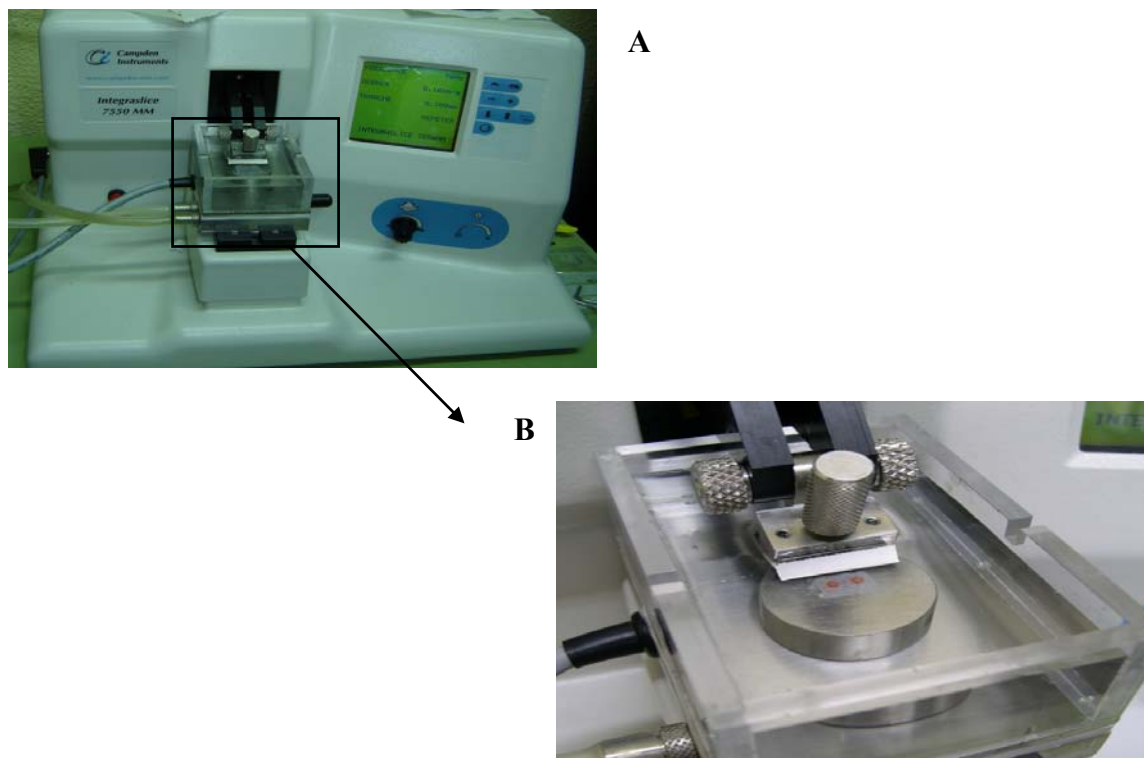


Figura 3.2. Vibratomo Integraslice 7550MM. (A) Vista general. (B) Detalle de la cuchilla y de la platina en la que se sitúa el tejido. Ambas se alojan en el interior de una cubeta dotada de un sistema de termostatación ($\sim 4^{\circ}\text{C}$).

3.1.3.3. Registro electrofisiológico

- Agitador termostatzado (Velp Scientifica, Italia)
- Amplificador de *patch-clamp* EPC9 (HEKA Elektronik, Alemania)
- Amplificador de *patch-clamp* EPC10 (HEKA Elektronik, Alemania)
- Cámara DL604M-OEM (Andor, EEUU)
- Electroválvulas LFAA12001718H (The Lee Company, Alemania)
- Estirador vertical programable PP830 (Narishige, Reino Unido)
- Mesa antivibratoria 63-530 (TMC, México)
- Mesa antivibratoria LW3036B-OPT (Newport, EEUU)
- Microforja MF830 (Narishige, Reino Unido)
- Micromanipulador MLW-3 (Narishige, Japón)
- Microscopio BX51WI (Olympus, Japón)

- Microscopio invertido Zeiss Axiovert 100 (Zeiss, España)
- Ordenador HP xw4300 WorkStation
- Ordenador Samsung B2230H
- Sistema de administración neumática de fármacos PDES-02DX (npi electronic, Alemania)
- Unidad de electroestimulación ISO-STIM 01D (npi electronic, Alemania)
- 2x Compresor 6-4, 1112000 (Jun-Air, Dinamarca)
- 3x Micromanipulador PCS-P560 (Burleigh, EEUU)

3.1.3.4. Inmunocitoquímicas

- HP xw6600 WorkStation
- Microscopio confocal TCR 6500 (Leica Microsystems, España).

3.1.3.5. Microscopía de fluorescencia funcional

- Cámara digital EM-CCD C9100 (Hamamatsu, Japón)
- Intercambiador de filtros MT20 (Olympus, Japón)
- Microscopio IX81 (Olympus, Japón)
- Objetivo UAPO 40x (Olympus, España)
- Sistema de administración de fármacos VC-6 (Warner Instruments, EEUU)
- Sistema de control de temperatura TC324B (Warner Instruments, EEUU)

3.1.4. Programas informáticos

- ADOBE Illustrator (Adobe Systems, EEUU)
- Cell R (Olympus, España)
- Clampfit 9.0 (Axon Instruments, Inc., EEUU)
- GraphPad Prism v5.01 (GraphPad Software Inc., EEUU)
- Igor Pro 5.05 (WaveMetrics, EEUU)
- LAS AF v2.2.1 (Leica Microsystems, España)
- Micro-Manager 1.3 (Micro-Manager, EEUU)
- PatchMaster v2x65 (HEKA Elektronik, Alemania)
- Pulsefit v2x65 (HEKA Elektronik, Alemania)

3.1.5. Reactivos y productos químicos

Los productos químicos utilizados en los distintos procedimientos así como su procedencia aparecen consignados en la **Tabla 3.1**.

Tabla 3.1. Relación de compuestos y reactivos

Uso y categoría	Reactivo	Casa comercial
Cultivo de células cromafines y neuronas DRG	Solución salina de Hank, solución de penicilina, estreptomicina y anfotericina B, medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), poli-L-lisina, collagenasa XI, azul tripán, Glutamax Colagenasa Tipo 1 Suero bovino fetal	Sigma-Aldrich Co., España Worthington, EEUU Biowhittaker, Reino Unido
Registros Electrofisiológicos Agonistas colinérgicos	Acetilcolina, nicotina, oxotremorina-M N-(3R)-1-Azabicyclo (2.2.2) oct-3yl-4-clorobenzamida hidroclicorada (PNU-282987), (E)-N-metil-4-(3-piridinil)-3-butano-1-amino (RJR-2403)	Sigma-Aldrich Co., Reino Unido Tocris, Bioscience, Reino Unido
Agonistas GABAérgicos	Baclofeno	Sigma-Aldrich Co., España
Antagonistas nicotínicos	Metilicaconitina, α -bungarotoxina α -conotoxina RgIA, α -conotoxina ArIB α -conotoxina AulB, α -conotoxina M-II	Sigma-Aldrich Co., España Dr. M.J. McIntosh (Univ. de Utah) Tocris, Bioscience, Reino Unido Tocris, Bioscience, Reino Unido
Moduladores nicotínicos	1-(5-cloro-2,4-dimetoxi-fenil)-3-(5-metil-isoxazol-3il)-urea (PNU-120596)	Calbiochem, Alemania
Bloqueantes de canales de Na ⁺	Tetrodotoxina (TTX)	Sigma-Aldrich Co., España
Bloqueantes de canales de K ⁺	Apamina, caribdotoxina (ChTX)	Sigma-Aldrich Co., España
Sales y otros	Glutamato de Cs, glutamato de K, NaCl, KCl, [MgCl ₂ , CaCl ₂ , SO ₄ Ca, CsCl, CsOH, NaOH, HCl, Na ₂ ATP, Li ₂ GTP], ácido 4-(2-Hidroxietil) piperazin-1-etanosulfónico (HEPES), 4-(2-Hidroxietil) piperazin-1-etanosulfonato sódico (Na ⁺ HEPES), glucosa, dimetilsulfóxido (DMSO), ácido etilenglicol-bis(2-aminoetileter)-N,N,N',N'-tetraacético (EGTA), agar, sacarosa Etanol NaH ₂ PO ₄ , Na ₂ HPO ₄ , NaHCO ₃ , KH ₂ PO ₄ , HClO ₄	Merck, Alemania Panreac, España
Inmunocitoquímica Anticuerpos primarios	Anti- α 10 de conejo frente a rata Anti- α 9 (E-17) de cabra frente a rata Anti- α 7 (mAb 306) de ratón frente a rata	Assay Biotech., EEUU Santa Cruz Biotech, Inc., EEUU Sigma-Aldrich Co., España
Anticuerpos secundarios	Alexa Fluor 555, Alexa Fluor 488 Cy3 570	Life Technologies, España Jackson ImmunoResearch, EEUU
Otros	DAPI, Prolong Antifade Triton X-100, p-formaldehido, albúmina bovina, suero de cabra	Life Technologies, España Sigma-Aldrich Co., España
Microscopía de fluorescencia funcional Fluoróforo	Fura2-AM	Life Technologies, España
Agonista de los canales TRPV1	Capsaicina	Sigma-Aldrich Co., España
Determinación de CAs Solución	Ácido perclórico	Sigma-Aldrich Co., España

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Cultivo primario de células cromafines de la médula adrenal de la rata

Los animales fueron sacrificados mediante concusión y sometidos a una laparotomía media al objeto de extraer las glándulas adrenales en el menor tiempo posible. Una vez extraídas, las glándulas fueron sumergidas en solución salina de Hank (**Tabla 3.2**) fría (4 °C) a la que se había adicionado un preparado antibiótico a base de penicilina, estreptomicina y anfotericina B (100 U.mL⁻¹; 0,1 mg.mL⁻¹ y 0,25 µg.mL⁻¹, respectivamente). A continuación, bajo campana de flujo laminar (Hera Safe, Heraeus, Alemania) se procedió a la descapsulación de las glándulas seguida de la disección, extracción y fraccionamiento de las médulas adrenales. Posteriormente, se inició el proceso de digestión con colagenasa (500 U.mL⁻¹) que tuvo lugar a 37 °C durante 30 minutos y con agitación mecánica cada 10 minutos mediante pipeta Pasteur de vidrio. Tras centrifugar la suspensión celular a 230 x g en una centrífuga Universal 32R (Hettich, Alemania) a 4 °C durante 10 minutos, se descartó el sobrenadante y el precipitado celular fue resuspendido en el medio de cultivo de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM); (**Tabla 3.3**) suplementado con suero bovino fetal (5%) y con penicilina, estreptomicina y anfotericina B (100 U.mL⁻¹, 0,1 mg.mL⁻¹ y 0,25 µg.mL⁻¹, respectivamente).

Tabla 3.2. Composición de la solución salina de Hank

Compuesto	Concentración (g.L ⁻¹)
KCl	0,40000
KH ₂ PO ₄ (anhidro)	0,06000
NaHCO ₃	0,35000
NaCl	8,00000
Na ₂ HPO ₄ (anhidro)	0,04788
D-Glucosa	1,00000

Una vez contadas las células en cámara de Neubauer, se depositaron alícuotas de 0,5 mL de la suspensión celular a una densidad de 30.000 células.mL⁻¹ sobre cubreobjetos de 10 mm de diámetro (Menzel GMBH & Co., Alemania) previamente tratados con poli-L-lisina (1 mg.mL⁻¹ durante 30 minutos) y colocados en el interior de placas Petri (3-4 cubreobjetos por placa) de 35 mm de diámetro (Iwaki Brand Scitech Div., Japón). Finalmente, se adicionaron 1,5 mL de DMEN en el interior de cada placa Petri y se procedió al traslado de las células a un incubador Hera Cell (Heraeus, Alemania), donde se mantuvieron a 37 °C bajo una atmósfera de 5% de CO₂ y 95% de aire. El rendimiento medio de los cultivos fue de 100.000 células por glándula adrenal. En nuestro estudio se emplearon células mantenidas en cultivo durante 1-4 días (**Figura 3.3**).

Tabla 3.3. Composición del medio de Eagle modificado por Dulbecco

Compuesto	Concentración (g.L ⁻¹)
CaCl ₂ •2H ₂ O	0,26500
Fe(NO ₃) ₃ •9H ₂ O	0,00010
MgSO ₄	0,09767
KCl	0,40000
NaHCO ₃	3,70000
NaCl	6,40000
NaH ₂ PO ₄	0,10900
L-Arginina•HCl	0,08400
L-Cistina•2HCl	0,06260
L-Glutamina	0,58400
Glicina	0,03000
L-Histidina•HCl•H ₂ O	0,04200
L-Isoleucina	0,10500
L-Leucina	0,10500
L-Lisina•HCl	0,14600
L-Metionina	0,03000
L-Fenilalanina	0,06600
L-Serina	0,04200
L-Treonina	0,09500
L-Triptófano	0,01600
L-Tirosina•2Na•2H ₂ O	0,10379
L-Valina	0,09400
Cloruro de colina	0,00400
Ácido fólico	0,00400
mio-Inositol	0,00720
Niacinamida	0,00400
Ácido D-Pantoténico•½Ca	0,00400
Piridoxina•HCl	0,00400
Riboflavina	0,00040
Tiamina•HCl	0,00400
D-Glucosa	1,00000
Rojo de fenol•Na	0,01590
Ácido pirúvico•Na	0,11000

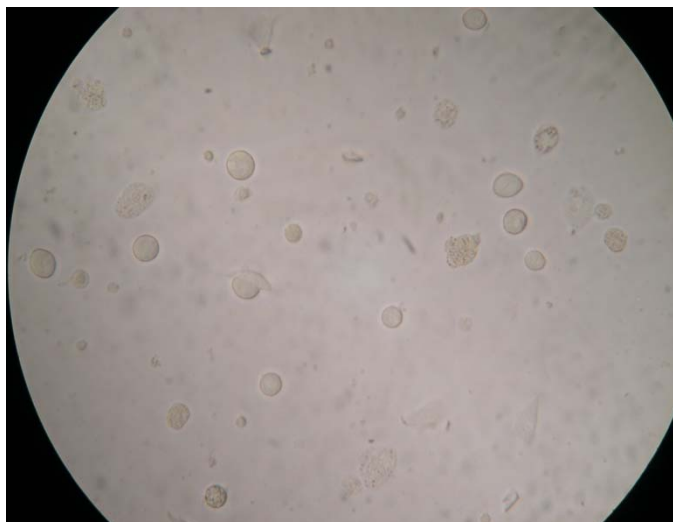


Figura 3.3. Cultivo primario de células cromafines de la médula adrenal de la rata. Imagen de microscopía de campo claro (400x).

3.2.2. Preparación de cortes de la glándula adrenal de rata y ratón

Una vez extraídas las glándulas adrenales como se ha descrito en el epígrafe anterior, se mantuvieron a 4 °C en una solución salina (composición en mM: 125 NaCl, 2,5 KCl, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 1,25 NaH₂PO₄, 26 NaHCO₃, y 12 glucosa; pH 7,4) continuamente burbujeada con carbógeno (95% O₂ / 5% CO₂) hasta ser colocadas sobre un bloque de agar adherido a la platina del vibratomo Integraslice 7550 MM (Campden Instruments, Reino Unido) alojada en el interior de una cubeta llena de solución salina a 4 °C (**Figura 3.2**). A continuación, las glándulas fueron seccionadas sagitalmente obteniéndose cortes de 200 µm de espesor que fueron sumergidos en solución salina y mantenidos a 37 °C en un incubador Hera Cell (Heraeus, Alemania). Los cortes fueron utilizados durante las ocho horas siguientes a su preparación (**Figura 3.4**).

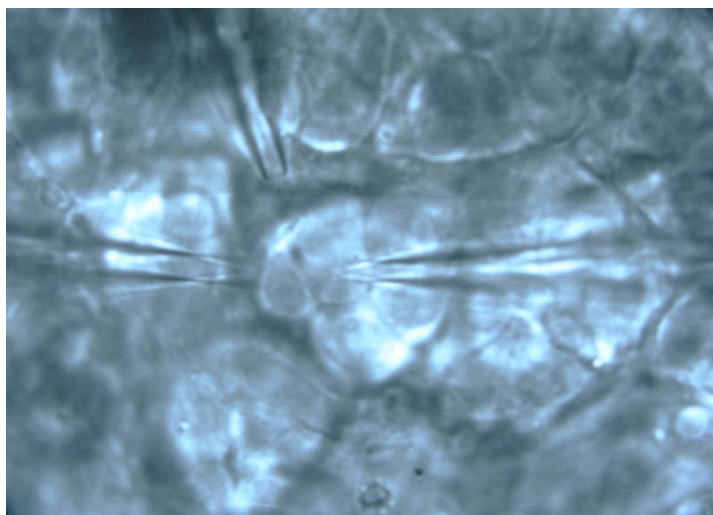


Figura 3.4. Imagen de la superficie de un corte de la glándula adrenal de la rata (630x). Se observa la organización de las células cromafines en islotes. Se muestra también una pipeta de *patch-clamp* en contacto con la membrana de una célula cromafín (1), así como dos pipetas de vidrio para la administración de fármacos (2, 3).

3.2.3. Cultivo primario de neuronas de los ganglios de las raíces dorsales de la médula espinal de la rata

Los animales fueron sacrificados mediante concusión y sometidos a una laparotomía lumbar a fin de extraer la columna vertebral lo más limpia posible de restos de piel y músculo. Una vez extraída, la columna fue lavada con una solución salina de Hank (**Tabla 3.2**) fría (4 °C). A continuación, bajo campana de flujo laminar Hera Safe (Heraeus, Alemania) se procedió a realizar una laminectomía a fin de poder extraer la médula espinal del canal raquídeo junto con los DRG desde L1 a L6. Posteriormente, y tras seccionar las raíces nerviosas los ganglios fueron sumergidos en una solución de DMEM glutamax a la que se había adicionado un preparado antibiótico a base de penicilina y estreptomicina (100 U.mL⁻¹ y 0,1 mg.mL⁻¹, respectivamente). Inmediatamente después, se llevó a cabo la digestión de los mismos con collagenasa XI (5 mg.mL⁻¹ en solución INC) (**Tabla 3.4**) durante 60 minutos a 37 °C. Tras realizar una primera centrifugación de la suspensión celular a 300 g en una centrífuga Universal 32R (Hettich, Alemania) a 4 °C durante 5 minutos, se descartó el sobrenadante y el precipitado celular fue resuspendido en medio DMEM suplementado con suero bovino fetal (10%) y preparado antibiótico (penicilina 100 U.mL⁻¹ y estreptomicina 0,1 mg.mL⁻¹). Subsiguientemente, se pasó la suspensión celular a través de un filtro de 100 µm y se procedió a una nueva centrifugación a 300 g durante 5 minutos, para finalmente volver a resuspender el precipitado celular en medio de cultivo DMEM.

Tabla 3.4. Composición de la solución INC

Compuesto	Concentración (g.L ⁻¹)
NaCl	9,0000
KH ₂ PO ₄ (anhidro)	0,26000
HEPES	1,3000
NaHEPES	1,3000
Glucosa	0,9000

El rendimiento de los cultivos fue bajo (unas decenas de miles de células) por lo que se depositaron directamente 40 µL de la suspensión celular sobre cubreobjetos de 10 mm de diámetro (Menzel GMBH & Co., Alemania) previamente tratados con poli-L-lisina y colocados en el interior de placas Petri (3-4 cubreobjetos por placa) de 35 mm de diámetro (Iwaki Brand Scitech Div., Japón). Finalmente, se adicionaron 2,5 mL de DMEM en el interior de cada placa y se procedió al traslado de las células a un incubador Hera Cell (Heraeus, Alemania), donde se mantuvieron a 37 °C bajo una atmósfera de 5% de CO₂ y 95% de aire durante 48 horas antes de su utilización.

3.2.4. Protocolo de estrés por frío

El protocolo de estrés por frío coincidió con el empleado por Colomer y col. (2008), consistente en la exposición a una temperatura ambiente de 4 °C de forma continua durante 5 días. Para ello, las ratas SD, alojadas en jaulas individuales de plástico, fueron introducidas en un refrigerador con puerta de cristal. Los animales control se mantuvieron a la temperatura ambiente del local (26°C). Las condiciones de estabulación incluían el acceso a comida y agua de bebida *ad libitum* y el empleo de periodos alternos de luz y oscuridad de 12 h (luz de 9:00 AM – 9:00 PM).

3.2.5. Fijación de voltaje en parches de membrana (*Patch-clamp*)

La técnica electrofisiológica de *patch-clamp* (Hamill, Marty et al. 1981) se fundamenta en la técnica de fijación de voltaje inventada en 1949 por Kenneth Cole (Cole 1949) y perfeccionada en los años siguientes por Alan Hodgkin y Andrew Huxley (Hodgkin and Huxley 1952, Hodgkin, Huxley et al. 1952).

Originalmente, la fijación de voltaje se lograba con una fuente de corriente conectada a una pareja de electrodos situados en el exterior (electrodo de referencia) y en el interior de la célula. Al inyectar corriente eléctrica a través del electrodo intracelular es posible llevar el potencial de la célula hasta valores previamente establecidos. La fijación de voltaje requiere de un sistema de retroalimentación negativa en el que el valor de entrada del sistema se utiliza para alimentar la salida

del mismo tras compararlo con un valor programado. Cualquier diferencia entre el potencial programado y la señal de entrada activa un sistema de control que automáticamente anula la diferencia.

La técnica de fijación de voltaje en parches de membrana o *patch-clamp* permite mantener de forma estable el potencial de toda la membrana de una célula (configuración de célula completa) o solamente la de una pequeña porción de la misma (configuraciones de parche adherido o escindido), y registrar la corriente generada por el flujo de iones a través de los canales presentes en la membrana (modo de fijación de voltaje). Alternativamente, esta técnica también puede ser empleada para medir la modificación del potencial de membrana en respuesta a la inyección de pulsos de corriente (modo de fijación de corriente) (Hamill y col., 1981). Si la corriente es fijada a 0 pA en la configuración de célula completa, el voltaje medido por el amplificador corresponderá al V_r , que depende de cambios espontáneos en las conductancias iónicas de la membrana plasmática.

En la técnica de *patch-clamp* se emplea como electrodo de registro una micropipeta de vidrio, cuya punta una vez pulida al calor posee un diámetro de aproximadamente 1 μm . La micropipeta debe rellenarse con una solución iónica que asegura la continuidad eléctrica con un filamento de plata clorurada. La composición de esta solución puede variar en función de la corriente iónica que vaya a estudiarse y, además de sales inorgánicas puede contener compuestos orgánicos como el monofosfato cíclico de adenosina (AMP_c), el ATP, el trifosfato de guanosina (GTP), tampones Ca^{2+} o de pH, etc.

La técnica puede emplearse en cuatro configuraciones distintas (**Figura 3.5**):

1. Configuración de parche sobre célula entera o parche adherido (*on-cell patch*). Es la configuración que da nombre a la técnica y que obligatoriamente precede a todas las demás. Se alcanza cuando la micropipeta entra en contacto con la membrana de la célula y la aplicación de presión negativa (5-20 mm de H_2O) en el interior de la misma da lugar a la formación de una unión (sello) de elevada resistencia mecánica y eléctrica (1 $\text{G}\Omega$, *gigasello*) entre ambos elementos y, eventualmente, a la invaginación de una pequeña porción o parche de membrana en la pipeta (figura en omega). Permite registrar las corrientes generadas por la activación de un número reducido de canales (1-10) en una región circular (parche) de la membrana celular.
2. Configuración de célula completa (*whole-cell*). Permite registrar la corriente iónica resultante de la actividad de los canales presentes en la práctica totalidad de la membrana celular. A ella se accede desde la configuración de parche adherido tras la aplicación de un pulso de succión o de voltaje que rompe el parche de membrana delimitado por el sello. Es la configuración utilizada en este trabajo.
3. Configuración de parche escindido interior hacia afuera (*inside-out patch*). En esta configuración la cara citosólica de un parche de membrana queda expuesta a la solución

extracelular, mientras que la cara externa queda en contacto con la solución contenida en la pipeta de registro. La escisión del parche de membrana se produce al desplazar la pipeta de vidrio en la configuración de parche adherido hasta perder contacto con la célula. Permite la rápida modificación de la solución en contacto con la cara interna de la membrana, favoreciendo el estudio de la modulación de la actividad de los canales iónicos por segundos mensajeros (Ca^{2+} , AMPc, etc.)

4. Configuración de parche escindido exterior hacia afuera (*outside-out patch*). Corresponde a la situación inversa a la del parche interior hacia afuera. A esta configuración se accede desde la configuración de célula completa al desplazar la pipeta de vidrio. Permite el registro de la actividad de canales individuales activados por ligandos (agonista) exógenos.

La configuración de célula completa permite un control adecuado del medio intracelular debido al rápido intercambio difusional de pequeñas moléculas (sales inorgánicas, nucleótidos, péptidos, etc.) entre la solución que rellena la micropipeta y el citosol. Si bien esta configuración brinda al investigador la posibilidad de definir la composición del medio intracelular de la forma más conveniente a los propósitos de su investigación (por ejemplo, para poder registrar una determinada corriente iónica mientras se bloquean las restantes), supone también la pérdida por dilución (*washout*) de una serie de sustancias de naturaleza no siempre conocida y que pueden resultar esenciales para el mantenimiento de las funciones celulares, incluyendo la actividad de algunos canales iónicos (por ejemplo, los canales de Ca_v) o la exocitosis. La principal consecuencia de esta pérdida de algunos componentes celulares es la progresiva desaparición (*run-down*) de las respuestas dependientes de los mismos, con la consiguiente reducción del tiempo del que dispone el investigador para su estudio. Debe señalarse, no obstante, que dicho fenómeno no parece afectar a las corrientes mediadas por los nAChRs, que han sido el principal objeto de estudio en este trabajo. Por otra parte, en la mayoría de los experimentos descritos en el apartado de RESULTADOS en los que se registraron corrientes mediadas por canales dependientes de voltaje, el tiempo de diálisis intracelular (configuración de célula completa) no excedió los 5 minutos.

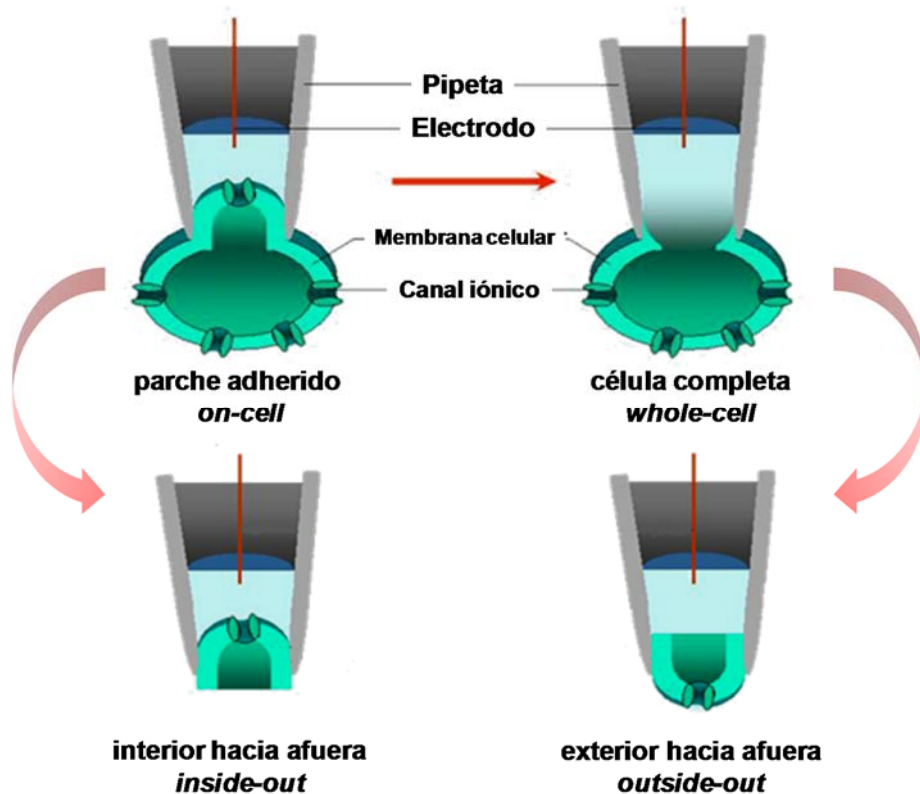


Figura 3.5. Configuraciones de la técnica de *patch-clamp*. La configuración de partida es la de parche adherido (*on-cell*), consistente en la formación de un sello de alta resistencia entre el borde de una pipeta de vidrio y la membrana celular. Cuando se aparta la pipeta de vidrio en la configuración *on-cell* y se pierde contacto con la superficie celular es posible escindir el fragmento de membrana delimitada por el sello (configuración de parche adherido interior hacia afuera; *inside-out*). Alternativamente, es posible aplicar un pulso de succión en el interior de la pipeta en la configuración *on-cell* al objeto de que se rompa el parche de membrana contenido en la pipeta y establezca una continuidad eléctrica entre el interior celular y la pipeta característica de la configuración de célula completa (*whole-cell*). Desde esta configuración, basta con retirar la pipeta de la célula para que se forme una vesícula membranosa en la que la superficie expuesta al medio extracelular corresponde a la cara externa de la membrana plasmática (configuración exterior hacia afuera; *outside-out*).

3.2.5.1. Registro de corrientes iónicas y del potencial de membrana con la técnica de *patch-clamp* en células cromafines aisladas y neuronas del ganglio de la raíz dorsal de la rata

Los registros electrofisiológicos se realizaron con un amplificador de *patch-clamp* modelo EPC9 (HEKA Elektronik, Alemania) controlado desde un ordenador Samsung B2230H mediante el programa PatchMaster V2x65 (HEKA Elektronik, Alemania). Se emplearon micropipetas de vidrio fabricadas con un estirador vertical programable modelo PP830 (Narishige, Reino Unido) a partir de capilares de borosilicato con diámetros interno y externo de 1,5 y 1,8 mm, respectivamente (Gerresheimer, Alemania). Las puntas de las pipetas fueron recubiertas con cera y pulidas mediante calor con una microforja MF830 (Narishige, Reino Unido), quedando posteriormente almacenadas al resguardo de la suciedad hasta el momento de su utilización en los registros. Una vez rellenas

con la solución interna y sumergidas en la solución externa (véase más adelante), las pipetas presentaron una resistencia de 2,5 a 3,5 M Ω .

Unos minutos antes del comienzo del experimento, tanto las células cromafines como las neuronas DRGs, adheridas a cubreobjetos, fueron transferidas desde el incubador hasta una cámara de metacrilato adaptada para la perfusión, que se situó sobre la platina de un microscopio invertido Zeiss Axiovert 100 (Zeiss, España). Una vez allí, las células fueron superfundidas continuamente (2 mL.min⁻¹) durante la totalidad del experimento con una solución salina a temperatura ambiente (22-26 °C).

Para el registro de las corrientes iónicas de la membrana celular se empleó la configuración de célula completa de la técnica de *patch-clamp* en la modalidad de fijación de voltaje, con monitorización continua de la capacidad de la membrana celular y de las Rs, que nunca excedieron los 15 M Ω . El valor medio de la capacidad de las células empleadas en los experimentos fue de $5,8 \pm 0,4$ pF (n = 19) y 84 ± 24 pF (n = 13), para las células cromafines y las neuronas DRG, respectivamente. Salvo indicación en contra, el potencial de fijación (V_h) fue de -70 mV. En todos los protocolos que incluyeron cambios rápidos en el potencial de membrana se empleó el método P/n (P/4) para la sustracción automática de corrientes capacitativas y de fuga (Bezanilla and Armstrong 1977).

El potencial de membrana de las células cromafines aisladas fue registrado en la modalidad de fijación de corriente inyectando la corriente (I_{comm}) adecuada para el registro de V_r ($I_{comm} = 0$ pA) o para inducir el disparo de trenes de potenciales de acción. En este caso, el valor de I_{comm} variaba entre las distintas células en función, fundamentalmente, de la resistencia de la membrana de las mismas.

Las soluciones empleadas para el registro de las corrientes mediadas por nAChRs tanto en células cromafines como en neuronas DRGs, así como, de las producidas a través de canales de Na⁺ y de K⁺ o del potencial de membrana de las células cromafines fueron las siguientes: solución extracelular (mM): NaCl 145, KCl 2,8, CaCl₂ 2, MgCl₂ 2, HEPES 10, glucosa 10; pH ajustado a 7,2 con HCl o NaOH (~ 300 mOSm); solución intracelular (mM): KCl 140, EGTA 10, Na₂ ATP 2, Li₂ GTP 0,3, HEPES 10; pH ajustado a 7,2 con KOH (~ 280 mOSm). En los experimentos en los que se registraron las corrientes a través de canales Ca_v de las células cromafines, la composición de la solución intracelular fue la siguiente (mM): ClCs 140, EGTA 10, ATP.Na₂ 2, GTP.Li₂ 0,3, HEPES 10; pH ajustado a 7,2 con CsOH (~ 280 mOSm). Para el registro de las corrientes a través de los canales Ca_v de las neuronas DRG se emplearon las siguientes soluciones: solución extracelular (mM): NaCl 145, KCl 2,8, CaCl₂ 2, MgCl₂ 2, HEPES 10, glucosa 10; pH ajustado a 7,2 con HCl o NaOH (~ 300 mOSm) y solución intracelular (mM): ClCs 140, EGTA 10, ATP.Na₂ 2, GTP.Li₂ 0,3, HEPES 10; pH ajustado a 7,2 con CsOH (~ 280 mOSm). La solución extracelular se preparó diariamente en tanto que la intracelular semanalmente.

Las corrientes nicotínicas así como las generadas por la despolarización de la membrana fueron filtradas a 2 KHz y digitalizadas a 4 KHz para su posterior análisis y representación gráfica.

Las medidas de la amplitud de las corrientes y de los cambios en el potencial de membrana se realizaron mediante los programas PatchMaster V2x65 y Pulsefit V2x65 (HEKA Elektronik, Alemania), mientras que para la representación del curso temporal de las respuestas a lo largo de los experimentos se empleó el programa Igor Pro 5.05 (WaveMetrics, EEUU).

3.2.5.2. Registro de corrientes iónicas y del potencial de membrana en cortes de la glándula adrenal de rata y de ratón

En los registros electrofisiológicos en cortes de tejido adenomedular se empleó un microscopio directo BX51WI (Olympus) dotado de una cámara de perfusión en la que se colocaban los cortes de tejido sujetos mediante una rejilla de hilo de nylon, de fabricación doméstica, y un amplificador EPC10 (HEKA Elektronik, Alemania). Se utilizaron pipetas de borosilicato (1,17 mm de diámetro interno y 1,5 mm de diámetro externo) que presentaron resistencias de 5-8 M Ω una vez rellenas con la solución intracelular y sumergidas en la solución extracelular. La composición de la solución intracelular fue (mM): KCl 145, MgCl₂ 2, EGTA 0,3, GTP.Li₂ 0,3, ATP.Na₂ 2, HEPES 10; pH ajustado a 7,2 con KOH (~280 mOSm). La solución extracelular, que se perfundía continuamente sobre la preparación (1 mL·min⁻¹), tuvo la siguiente composición (mM): NaCl 125, KCl 2,5, CaCl₂ 2, MgCl₂ 1, NaH₂PO₄ 1,25, NaHCO₃ 26, glucosa 12; pH ajustado a 7,4 mediante gasificación continua con carbógeno (~300 mOSm).

El potencial de membrana de las células cromafines en cortes de tejido fue registrado bajo la modalidad de fijación de corriente de forma análoga a la descrita para las células cromafines aisladas, mientras que el registro de las EPSCs (espontáneas o inducidas eléctricamente) así como de las corrientes inducidas por la administración de ACh exógena se realizó en la modalidad de fijación de voltaje a un V_h de -80 mV, con monitorización de la capacidad celular y de las R_s, que nunca excedieron los 20 m Ω . La capacidad media de una muestra de células cromafines en cortes de tejido fue de 10,4 \pm 3 pF (n = 36). Las señales eléctricas fueron filtradas a 1 (voltaje) ó 3 (corriente) KHz y adquiridas a una frecuencia de 10 KHz en un HP xw4300 WorkStation mediante el programa PatchMaster V2x65 (HEKA Elektronik, Alemania).

El registro de las corrientes sinápticas espontáneas así como de la descarga de potenciales de acción en condiciones de reposo se realizó durante 4 minutos en ausencia y en presencia de antagonistas o moduladores de nAChRs

3.2.5.3. Administración de fármacos

La administración de fármacos en células aisladas se realizó directamente sobre la célula en estudio mediante un sistema de perfusión por gravedad que constaba de cinco vías reguladas por electroválvulas LFAA12001718H (The Lee Company, Alemania) controladas con el programa PatchMaster v2x65 (HEKA Elektronik, Alemania). La salida del sistema se colocó aproximadamente a 100 μm de la célula, de forma que el flujo de las soluciones aseguraba el recambio del medio que rodeaba a la célula en ~ 30 ms. La estimulación con los fármacos agonistas se realizó mediante pulsos breves (500 ms) administrados tres veces consecutivas a intervalos de 45 s, calculándose posteriormente la media de las respuestas obtenidas (pulsos 1º, 2º y 3º). El efecto de los fármacos antagonistas también se evaluó por triplicado en cada experimento, perfundiéndose en el baño durante 2-5 minutos antes de ser aplicados localmente con el agonista (pulsos 4º, 5º y 6º). Finalmente, el agonista podía ser administrado tres veces más durante el período de lavado del antagonista con objeto de estudiar la reversibilidad del efecto de este último (pulsos 7º, 8º y 9º).

Por otra parte, para la administración de fármacos en las preparaciones de cortes de la glándula adrenal se empleó un dispositivo de eyección neumática de doble canal PDES-02DX (npi electronic, Alemania). La salida del sistema consistía en una pipeta de borosilicato rellena con una disolución del fármaco, que era expulsada sobre la célula objeto de estudio situada a ~ 10 μm de la punta (2-4 μm de diámetro) de la pipeta. La administración del fármaco se realizaba mediante la administración de pulsos de presión (0,2-0,5 bar) de 50-250 ms (fármacos agonistas) ó 2-5 min (fármacos antagonistas) bajo el control del programa PatchMaster v2x65 (HEKA Elektronik, Alemania). Ocasionalmente, la administración de fármacos a los cortes de tejido se realizó mediante la incorporación de los mismos al sistema de perfusión del baño.

Las disoluciones de los fármacos en la solución extracelular se prepararon diariamente a partir de soluciones acuosas concentradas (10^{-1} - 10^{-3} M) de los mismos. La nicotina constituyó una excepción, ya que fue inicialmente disuelta en etanol. La concentración final de este solvente en la solución extracelular fue siempre inferior al 0,1%.

3.2.5.4. Estimulación eléctrica de campo

En la estimulación eléctrica de los cortes de la glándula adrenal se emplearon electrodos bipolares de tungsteno e impedancia de 2 $\text{M}\Omega$ (modelo TST33A10; WPI Inc., Sarasota, FL) conectados a una unidad de electroestimulación ISO-STIM 01D (npi elektronik, Alemania) controlada desde el programa PatchMaster v2x65 (HEKA Elektronik, Alemania). El dispositivo de estimulación constaba de dos electrodos de tungsteno de 1 μm en su extremo final separados entre sí por una distancia variable (30 - 120 μm), lo que permitía limitar la estimulación eléctrica al islote celular al que pertenecía la célula en estudio (**Figura 3.6**).

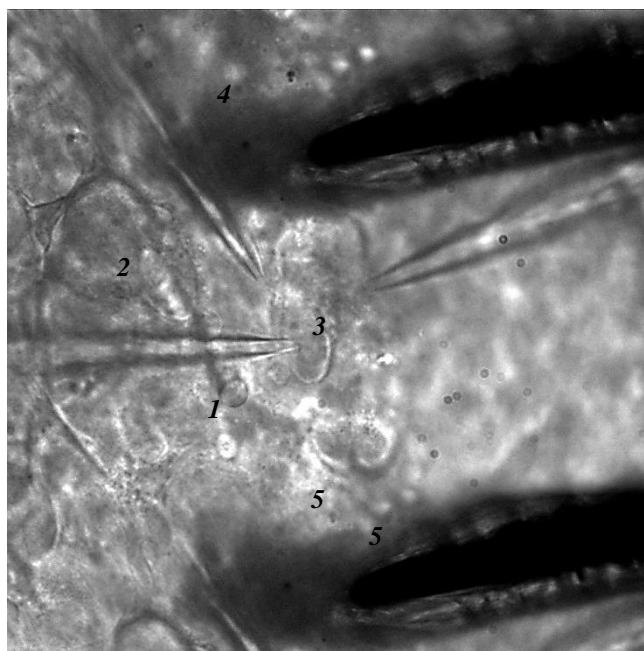


Figura 3.6. Imagen de un corte de la glándula adrenal de rata durante un experimento electrofisiológico en el que se combinaba la estimulación eléctrica de campo con la administración de fármacos. Se muestran diferentes pipetas de vidrio: pipeta de *patch.clamp* (1), pipetas de administración de fármacos (2, 3), pipetas (extremos de los electrodos de tungsteno del sistema de estimulación eléctrica (4, 5).

Se emplearon estímulos bifásicos ($50 \mu\text{s}/\text{fase}$) de intensidad suficiente ($\approx 50 \text{ V}$; ver sección de RESULTADOS) para inducir respuestas sinápticas (EPSCs o EPSPs) a frecuencias desde $0,1 \text{ Hz}$ hasta 10 Hz .

3.2.6. Marcaje inmunocitoquímico de los nAChRs en células cromafines de rata y de ratón y en células de los ganglios dorsales de la rata

En este tipo de experimentos se emplearon células cromafines de rata, células cromafines de ratón, procedentes tanto de animales control de la cepa CBA CaJ como modificados genéticamente ($\alpha 9\text{KO}$) y células DRG de la rata aisladas y mantenidas en cultivo sobre cubreobjetos un mínimo de 48 h. El marcaje se llevó a cabo en células lavadas con tampón fosfato (PBS), fijadas con p-formaldehído (4%) y permeabilizadas con Triton X-100 (0,1%) durante 30 minutos a temperatura ambiente. La composición del PBS fue la siguiente (mM): NaCl 136, KCl 2, Na_2HPO_4 8, KH_2PO_4 2 (pH ajustado a 7,2). Los anticuerpos utilizados así como las diluciones a las que se emplearon aparecen recogidos en la **Tabla 3.5**. Para disminuir el marcaje no específico, se añadió suero de cabra (5%) y albúmina sérica bovina (3%) al medio que contenía el anticuerpo primario, incubándose las células con esta mezcla durante toda la noche a 4°C . Tras lavar las células varias veces con PBS, se volvieron a incubar con el correspondiente anticuerpo secundario fluorescente durante una hora y en

oscuridad. Finalmente, los cubreobjetos se montaron en portaobjetos con un medio Prolong Antifade (Life Technologies) que reduce el apagamiento de los fluorocromos. Las preparaciones se almacenaron en oscuridad a 4°C. En todos los casos se realizó un control negativo omitiendo la incubación con el anticuerpo primario. La señal fluorescente fue visualizada a través de un microscopio confocal TCR 6500 (Leica Microsystems, España) y las imágenes fueron adquiridas mediante el software LAS AF v2.2.1 (Leica Microsystems, España).

Tabla 3.5. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados en los experimentos de inmunocitoquímica

Anticuerpo Primario	Características	Dilución
Anti- α 10 I (anticuerpo policlonal de conejo)	Reconoce un epítipo de 15 aminoácidos situado entre los residuos 404-418 de la subunidad α 10 de rata (NH ₂ -RSHRAAQRRHEDWKR-CONH ₂)	1:500
Anti- α 9 (E-17; anticuerpo policlonal de cabra)	Reconoce un epítipo en el extremo N-terminal de la subunidad α 9 de rata	1:250
Anti- α 7 (mAb 306; anticuerpo monoclonal de ratón)	Reconoce un epítipo del bucle intracelular entre los segmentos M3 y M4 de la subunidad α 7 de rata	1:400

Anticuerpo Secundario	Características	Dilución
Alexa Fluor 555	Conejo frente a ratón	1:400
Alexa Fluor 488	Cabra frente a conejo	1:400
Cy3 570	Burro frente a conejo	1:400

3.2.7. Determinación fluorométrica de la concentración citosólica de Ca²⁺ en células de los ganglios de las raíces dorsales de la rata

La concentración citosólica de Ca²⁺ libre ([Ca²⁺]_i) en las células DRG de la rata se determinó utilizando un método fluométrico mediante sonda fura-2. El fura-2 es un compuesto polianiónico capaz de unirse al Ca²⁺ de forma específica y emitir luz fluorescente. La formación del complejo fura-2-Ca desplaza el espectro de excitación de la sonda hacia el ultravioleta, desde un valor máximo de 380 nm hasta el de 340 nm. El espectro de emisión de fluorescencia es, sin embargo, independiente de la concentración de Ca²⁺ y alcanza un valor máximo a la longitud de onda de 510 nm. La [Ca²⁺]_i se calculó a partir de la relación de las fluorescencias excitadas con luz de 340 nm y 380 nm (F340/F380), de acuerdo con la ecuación de Grynkiewicz y cols. (1985) implementada en la aplicación de adquisición y análisis de la fluorescencia (véase más abajo):

$$[Ca^{2+}]_i = K_{eff} (R - R_{min}) / (R_{max} - R)$$

donde K_{eff} es una constante de unión efectiva, R_{min} es la relación de fluorescencias cuando la $[\text{Ca}^{2+}] = 0$, y R_{max} la relación cuando la $[\text{Ca}^{2+}]$ es máxima (mM). La K_{eff} y los valores de R_{min} y R_{max} fueron determinados *in vitro* mediante el empleo de soluciones con $[\text{Ca}^{2+}]$ conocidas.

En los experimentos se empleó la forma acetoximetiléster (AM) del fura-2, que es capaz de acceder al citosol mediante difusión a través de la membrana celular. Una vez en el interior de las células, esterasas inespecíficas rompen el enlace éster de forma que la forma ionizada de la sonda queda confinada en las células. El día del experimento, las células DRG, sembradas en cubreobjetos, fueron inicialmente lavadas con solución de Ringer (NaCl 145, KCl 2,8, CaCl_2 2, MgCl_2 2, HEPES 10, glucosa 10; pH ajustado a 7,2 con HCl o NaOH (~ 300 mOSm) y, a continuación, incubadas en la misma solución conteniendo fura-2 AM (7,5 μM) durante 45 min a 37 °C y protegidas de la luz. Tras finalizar la incubación, los cubreobjetos fueron transferidos al interior de una cámara de perfusión y superfundidos (1.5 mL/min) de forma continua mediante gravedad con solución de Ringer durante el resto del experimento. Los distintos fármacos disueltos en solución de Ringer se administraron por perfusión en el baño, durante 30 s a intervalos de 4 min, mediante la apertura manual de las válvulas electrónicas VC-6 (Warner Instruments, EEUU). Todas las soluciones fueron termostatizadas a 37 °C (sistema TC344; Warner Instruments, EEUU) antes de acceder a la cámara de perfusión.

El equipo de microfluorimetría utilizado consistió en un microscopio invertido (Olympus IX81) equipado con una lámpara de Hg y un sistema de cambio de filtros de excitación e iluminación de epifluorescencia MT20 (Olympus, España). La luz fue recogida con un objetivo UAPO 40x (A.N. = 1,15; Olympus, España), mientras que se utilizó una cámara Hamamatsu C9100 (Cerdanyola, España) para la detección de la fluorescencia. El tiempo de exposición fue de 100 ms y el intervalo de adquisición de imágenes de 1 s. Las señales fluorescentes analizadas provenían de regiones elípticas situadas sobre los cuerpos de las células. Con carácter previo a la determinación de F340/F380 se sustrajo de la secuencia de imágenes de cada longitud de onda el valor de la fluorescencia basal. La adquisición de imágenes y la cuantificación de las señales se realizó con la aplicación CellR (Olympus, España).

3.2.8. Determinación del contenido de catecolaminas de las glándulas adrenales de rata

Los animales, sacrificados mediante concusión, fueron sometidos a una laparotomía media al objeto de extraer las glándulas adrenales en el menor tiempo posible. Una vez extraídas e identificadas (derecha e izquierda), las glándulas fueron limpiadas en solución de Hank fría (4 °C). Seguidamente, y tras secarlas con papel de filtro y pesarlas, fueron transferidas a un microtubo conteniendo 500 μL de una solución de ácido perclórico 0,1 N, procediéndose a su homogenización mediante sonicación con émbolo en frío. El homogenado se centrifugó a 3000 x g durante 10 minutos

a 4 °C. El sobrenadante y el precipitado fueron recogidos por separado y congelados a -70 °C hasta su análisis mediante cromatografía líquida de alta eficacia por la Dra. Ana Ruiz Nuño (Servicio de Farmacología Clínica, Hospital Universitario de la Princesa).

3.2.9. Análisis de la interacción de antagonistas nicotínicos

Cuando el efecto de la administración conjunta de dos o más fármacos es inferior al de la suma de los efectos de dichos fármacos se habla de antagonismo. Esta noción es independiente del carácter agonista o antagonistas de los fármacos y resulta también aplicable a la interacción de dos fármacos antagonistas en presencia de un fármaco agonista. En tales casos se observa que la administración de uno de fármacos antagonistas reduce (*occlude*, en inglés) el efecto de la administración posterior del otro. La diferencia existente entre la suma de los efectos de la administración individual y el efecto de la administración conjunta indica el grado de solapamiento del efecto de ambos fármacos, que suele atribuirse a la existencia de una diana común. Lógicamente, cuando la diferencia es cero, el solapamiento es completo y ambos fármacos actúan exclusivamente a través de la misma diana. Cuando el solapamiento es parcial, la comparación del efecto de cada uno de los fármacos con el de la suma de los dos permite estimar la importancia que tiene esa diana común en el efecto de cada uno de los fármacos. Por otra parte, la existencia de una diana común no presupone un idéntico mecanismo de acción o forma de interacción de los dos fármacos con ella.

Este razonamiento y el sencillo cálculo que lleva aparejado puede aplicarse a la identificación de nAChRs heteroméricos funcionales. En este escenario, la diana común sería el nAChR, si bien los fármacos actuarían sobre el mismo uniéndose a alguna de las subunidades que lo forman. Estos fármacos deben reunir las siguientes características:

a) Presentar afinidad por dos subunidades distintas constituyentes de los nAChRs. La precisión de las conclusiones que se obtengan será tanto mayor cuanto más selectivos sean los fármacos utilizados (por ejemplo, mayor si se emplea la α -AriB, que solo se une a la subunidad $\alpha 7$, en vez de la MLA, que puede unirse a las subunidades $\alpha 6$, $\alpha 7$, $\alpha 9$ y $\alpha 10$) o cuanto más nítida sea la diferencia en el perfil de selectividad de los dos fármacos utilizados (por ejemplo, solo uno de ellos se une a una subunidad determinada). Dichos perfiles de selectividad son críticos en la definición de los tipos de nAChRs heteroméricos sobre los que pueden realizarse inferencias.

b) Interferir con la activación del nAChR. En términos farmacológicos, se trataría de fármacos antagonistas que podrían actuar tanto de forma competitiva como no competitiva (moduladores alostéricos negativos). Los antagonistas competitivos muestran afinidad por las subunidades que interaccionen directamente con los fármacos agonistas, a los que desplazarán de su unión al nAChR. Debe señalarse que los nAChRs heteroméricos contienen solo dos sitios de unión

para los agonistas y que la ocupación de uno de ellos por un fármaco antagonista basta para impedir la activación (medida en forma de corrientes macroscópicas) del nAChR.

A continuación, se muestra el análisis aplicado a la identificación de nAChRs heteroméricos formados por las subunidades $\alpha 7$ y $\alpha 9$ y/o $\alpha 10$. Los fármacos utilizados fueron la α -ArlB, (50 nM), que se une selectivamente a la subunidad $\alpha 7$, y la α -RgIA (100 nM), que se une selectivamente a las subunidades $\alpha 9$ y $\alpha 10$. El uso combinado de ambas toxinas permite inferir la existencia de nAChRs heteroméricos de los tipos $\alpha 7\alpha 9$, $\alpha 7\alpha 10$ y $\alpha 7\alpha 9\alpha 10$, así como sobre otros posibles nAChRs heteroméricos formados por la asociación, por ejemplo, de la subunidades $\alpha 7$ y $\beta 2$. Debe precisarse, no obstante, que este abordaje no permite realizar inferencias sobre la estequiometría de los nAChRs ni sobre la abundancia relativa de las distintas combinaciones heteroméricas. El análisis, no obstante, posibilita realizar inferencias sobre la abundancia relativa de nAChRs sensibles solo a la α -ArlB (homoméricos $\alpha 7$) o a la α -RgIA (homoméricos $\alpha 9$ y heteroméricos $\alpha 9\alpha 10$).

Los diseños experimentales utilizados consistieron en la administración de una de las dos toxinas en solitario y, tras un periodo de lavado, la administración de la combinación de las dos toxinas. En células distintas se reprodujo el mismo diseño mediante la administración en solitario de la otra toxina. En todos los casos, el agonista utilizado fue la ACh (100 μ M). Se trata de un agonista nicotínico *universal*, capaz de activar todos los tipos de nAChRs. Los valores utilizados en este análisis aparecen recogidos en el epígrafe 4.3.2. de la sección de RESULTADOS.

Animales control

Experimento 1º. Administración de α -ArlB en solitario seguida de la combinación de ambas toxinas (α -ArlB + α -RgIA):

- Efecto de α -ArlB: Inhibición del $28 \pm 5\%$ de la corriente nicotínica; refleja el antagonismo de los nAChRs $\alpha 7^*$ (homomérico $\alpha 7$, heteromérico $\alpha 7$ con $\alpha 9$ y/o $\alpha 10$ y heteromérico $\alpha 7$ con otras subunidades).

- Efecto de α -RgIA+ α -ArlB: Inhibición del $36 \pm 5\%$ de la corriente nicotínica ($n = 5$); refleja el antagonismo de los nAChRs $\alpha 7^*$, $\alpha 9^*$ y $\alpha 10^*$.

- Efecto de α -RgIA tras la administración de α -ArlB (efecto de α -RgIA + α -ArlB - efecto de α -ArlB): $36 \pm 5\% - 28 \pm 5\% = 8 \pm 1\%$; refleja el antagonismo de los nAChRs homomérico $\alpha 9$, heteromérico $\alpha 9\alpha 10$ y el heteromérico $\alpha 9$ y/o $\alpha 10$ con otras subunidades (nAChRs $\alpha 9$ y/o $\alpha 10$ no heteroméricos con $\alpha 7$).

Experimento 2º. Administración de α -RgIA en solitario seguida de la combinación de ambas toxinas (α -RgIA + α -ArlB):

– Efecto de α -RgIA: Inhibición del $21 \pm 5\%$ de la corriente nicotínica; refleja el antagonismo de los nAChRs $\alpha 9^*$ y $\alpha 10^*$ (homomérico $\alpha 9$, heteromérico $\alpha 9\alpha 10$, heteromérico $\alpha 9$ y/o $\alpha 10$ con $\alpha 7$ y heteromérico $\alpha 9$ y/o $\alpha 10$ con otras subunidades).

– Efecto de α -ArIB + α -RgIA: Inhibición del $35 \pm 4\%$ de la corriente nicotínica ($n = 8$); refleja el antagonismo de los nAChRs $\alpha 7^*$, $\alpha 9^*$ y $\alpha 10^*$.

– Efecto de α -ArIB tras la administración de α -RgIA (efecto de α -ArIB + α -RgIA - efecto de α -RgIA): $35 \pm 4\% - 21 \pm 5\% = 14 \pm 5\%$; refleja el antagonismo de los nAChRs homomérico $\alpha 7$ y heteromérico $\alpha 7$ con otras subunidades (nAChRs $\alpha 7$ no heteroméricos con $\alpha 9$ y/o $\alpha 10$).

– nAChRs $\alpha 7$ heteroméricos con $\alpha 9$ y/o $\alpha 10$ (nAChRs $\alpha 7^*$ - nAChRs $\alpha 7$ no heteroméricos con $\alpha 9$ y/o $\alpha 10$ - nAChRs $\alpha 7^* \times 100$): $28-14/28 \times 100 = 50\%$ nAChRs $\alpha 7^*$.

– nAChRs $\alpha 9$ y/o $\alpha 10$ heteroméricos con $\alpha 7$ (nAChRs $\alpha 9^*$ y $\alpha 10^*$ - nAChRs $\alpha 9$ y/o $\alpha 10$ no heteroméricos con $\alpha 7$ - nAChRs $\alpha 9^*$ y $\alpha 10^* \times 100$): $28-14/28 \times 100 = 62\%$ nAChRs nAChRs $\alpha 9^*$ y $\alpha 10^*$.

Animales estresados

Experimento 1°. Administración de α -ArIB en solitario seguida de la combinación de ambas toxinas (α -ArIB + α -RgIA):

– Efecto de α -ArIB: Inhibición del $42 \pm 5\%$ de la corriente nicotínica; refleja el antagonismo de los nAChRs $\alpha 7^*$ (homomérico $\alpha 7$, heteromérico $\alpha 7$ con $\alpha 9$ y/o $\alpha 10$ y heteromérico $\alpha 7$ con otras subunidades).

– Efecto de α -RgIA + α -ArIB: Inhibición del $54 \pm 5\%$ de la corriente nicotínica ($n = 4$); refleja el antagonismo de los nAChRs $\alpha 7^*$, $\alpha 9^*$ y $\alpha 10^*$.

– Efecto de α -RgIA tras la administración de α -ArIB (efecto de α -RgIA + α -ArIB - efecto de α -ArIB): $54 \pm 5\% - 42 \pm 5\% = 12 \pm 3\%$; refleja el antagonismo de los nAChRs homomérico $\alpha 9$ y heteromérico $\alpha 9\alpha 10$ y el heteromérico $\alpha 9$ y/o $\alpha 10$ con otras subunidades (nAChRs $\alpha 9$ y/o $\alpha 10$ no heteroméricos con $\alpha 7$).

Experimento 2°. Administración de α -RgIA en solitario seguida de la combinación de ambas toxinas (α -RgIA + α -ArIB):

– Efecto de α -RgIA: Inhibición del $40 \pm 6\%$ de la corriente nicotínica; refleja el antagonismo de los nAChRs $\alpha 9^*$ y $\alpha 10^*$ (homomérico $\alpha 9$, heteromérico $\alpha 9\alpha 10$, heteromérico $\alpha 9$ y/o $\alpha 10$ con $\alpha 7$ y heteromérico $\alpha 9$ y/o $\alpha 10$ con otras subunidades).

– Efecto de α -ArIB + α -RgIA: Inhibición del $52 \pm 8\%$ de la corriente nicotínica ($n = 4$); refleja el antagonismo de los nAChRs $\alpha 7^*$, $\alpha 9^*$ y 10^* .

– Efecto de α -ArIB tras la administración de α -RgIA (efecto de α -ArIB + α -RgIA - efecto de α -RgIA): $52 \pm 8\% - 40 \pm 6\% = 12 \pm 3\%$; refleja el antagonismo de los nAChRs homomérico $\alpha 7$ y heteromérico $\alpha 7$ con otras subunidades (nAChRs $\alpha 7$ no heteroméricos con $\alpha 9$ y/o $\alpha 10$).

– nAChRs $\alpha 7$ heteroméricos con $\alpha 9$ y/o $\alpha 10$ (nAChRs $\alpha 7^*$ - nAChRs $\alpha 7$ no heteroméricos con $\alpha 9$ y/o $\alpha 10$ - nAChRs $\alpha 7^* \times 100$): $42-12/42 \times 100 = 71\%$ nAChRs $\alpha 7^*$.

– nAChRs $\alpha 9$ y/o $\alpha 10$ heteroméricos con $\alpha 7$ (nAChRs $\alpha 9^*$ y $\alpha 10^*$ - nAChRs $\alpha 9$ y/o $\alpha 10$ no heteroméricos con $\alpha 7$ - nAChRs $\alpha 9^*$ y $\alpha 10^* \times 100$): $40-12/40 \times 100 = 70\%$ nAChRs nAChRs $\alpha 9^*$ y $\alpha 10^*$.

3.2.10. Análisis estadístico

Los resultados aparecen expresados como media \pm error estándar de la media (ESM) de un determinado número (n) de experimentos. La comparación entre las medias correspondientes a dos grupos de datos se realizó mediante el test de la t de Student. La significación estadística de los porcentajes de inhibición de la corriente nicotínica producidos por los fármacos antagonistas se llevó a cabo mediante la comparación con un valor control del 100% (ausencia de inhibición) utilizando un test de la t Student para una sola muestra. Los cálculos estadísticos se realizaron con el programa GraphPad Prism v5.01. En todos los casos, los niveles de significación establecidos fueron $P < 0,001$ (***), $P < 0,01$ (**) y $P < 0,05$ (*). Los valores de P superiores a 0,05 se han considerado como no significativos (ns).

IV. RESULTADOS

4.1. ESTUDIO DE LA SELECTIVIDAD FARMACOLÓGICA DE LA α -CONOTOXINA RgIA

4.1.1. Efecto de la α -conotoxina RgIA sobre los nAChRs $\alpha 7$ de las células cromafines de la médula adrenal de rata

La disponibilidad de nuevas herramientas farmacológicas selectivas para los nAChRs $\alpha 7$ nos ha permitido caracterizar las corrientes iónicas mediadas por estos receptores en las células cromafines de la médula adrenal de rata, así como la valoración de los efectos de la α -RgIA sobre ellas. Para ello recurrimos al empleo de un agonista específico de los nAChRs $\alpha 7$, el PNU282987 (Bodnar y col., 2005). En consonancia con datos previos de nuestro grupo, indicativos de una muy baja densidad de nAChRs $\alpha 7$ en esta preparación (la corriente activada por GTS21, un agonista parcial de los nAChRs $\alpha 7$, es inferior al 1% de la inducida por ACh) (Olivos-Oré, 2009), el PNU282987 (30 μ M, 1 s) no indujo corriente alguna a través de la membrana de las células cromafines ($n = 10$). Sin embargo, la incubación previa con PNU120596 (1 μ M, 5 min), un modulador alostérico de los nAChRs $\alpha 7$ (Hurst y col., 2005), posibilitó que el PNU282987 indujera corrientes iónicas con amplitud máxima de 29 ± 13 pA ($n = 10$) y muy lenta desactivación, lo que indicaría la presencia de nAChRs $\alpha 7$ en las células cromafines de la rata. Este resultado se vio confirmado por la capacidad de la α -BgTx (100 nM), una toxina que bloquea de manera irreversible los nAChRs $\alpha 7$ (Couturier y col., 1990), para abolir la corriente inducida por la combinación de PNU282987 y PNU120596. Por el contrario, la administración de la α -RgIA (100 nM) no produjo efecto alguno sobre las corrientes inducidas por PNU282987 y PNU120596, lo que indicaría que dicha toxina no interactúa con nAChRs $\alpha 7$ homoméricos (**Figura 4.1**).

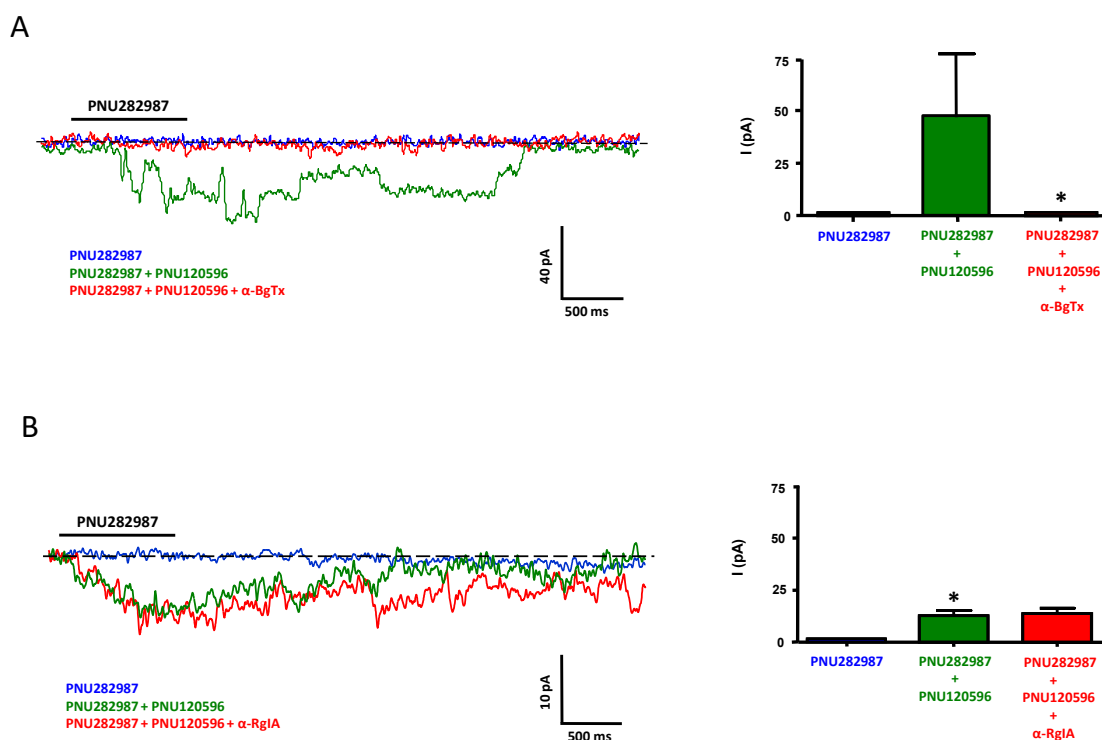


Figura. 4.1. Efecto de la α -BgTx y de la α -RgIA sobre las corrientes iónicas inducidas por PNU282987 en células cromafines de rata incubadas con PNU120596, un modulador alostérico de los nAChRs $\alpha 7$. **A.** Registros representativos y diagrama de barras del efecto bloqueante de la α -BgTx (100 nM; trazo rojo) sobre las corrientes inducidas por PNU282987 (30 μ M, 1 s; trazo azul) en presencia de PNU120596 (1 μ M; trazo verde) (n = 4). **B.** Registros representativos y diagrama de barras del efecto de la α -RgIA (100 nM; trazo rojo) sobre las corrientes inducidas por PNU282987 (30 μ M, 1 s; trazo azul) en presencia de PNU120596 (1 μ M; trazo verde) (n = 6). Obsérvese la incapacidad del PNU282987 para inducir corrientes iónicas a través de la membrana de las células cromafines de rata en ausencia del modulador alostérico. V_h = -70 mV. * $P < 0,05$ con respecto a PNU282987 o a la combinación de PNU282987 y PNU120596.

4.1.2. Efecto de la α -conotoxina RgIA sobre las corrientes nicotínicas de las células cromafines en cortes de la glándula adrenal de ratones $\alpha 9$ KO

Al objeto de comprobar la selectividad de la α -RgIA sobre los nAChRs $\alpha 9^*$ decidimos estudiar su efecto sobre las corrientes nicotínicas de las células cromafines de la médula adrenal de ratones de la cepa CBA CaJ, que carecen constitutivamente de la subunidad $\alpha 10$ de los nAChRs (Wu y col., 2010), y de animales de la misma cepa modificados genéticamente para eliminar la expresión de la subunidad $\alpha 9$ ($\alpha 9$ KO) (Vetter y col., 1999). Ambos extremos fueron confirmados mediante el genotipado de los ratones (Vetter y col., 1999) y la realización de inmunotransferencias (*western-blot*) en extractos de la glándula adrenal de ambos tipos de animales (resultados no mostrados). Así mismo, se recurrió al marcaje inmunocitoquímico para determinar la distribución subcelular de las subunidades $\alpha 7$, $\alpha 9$ y $\alpha 10$ de los nAChRs.

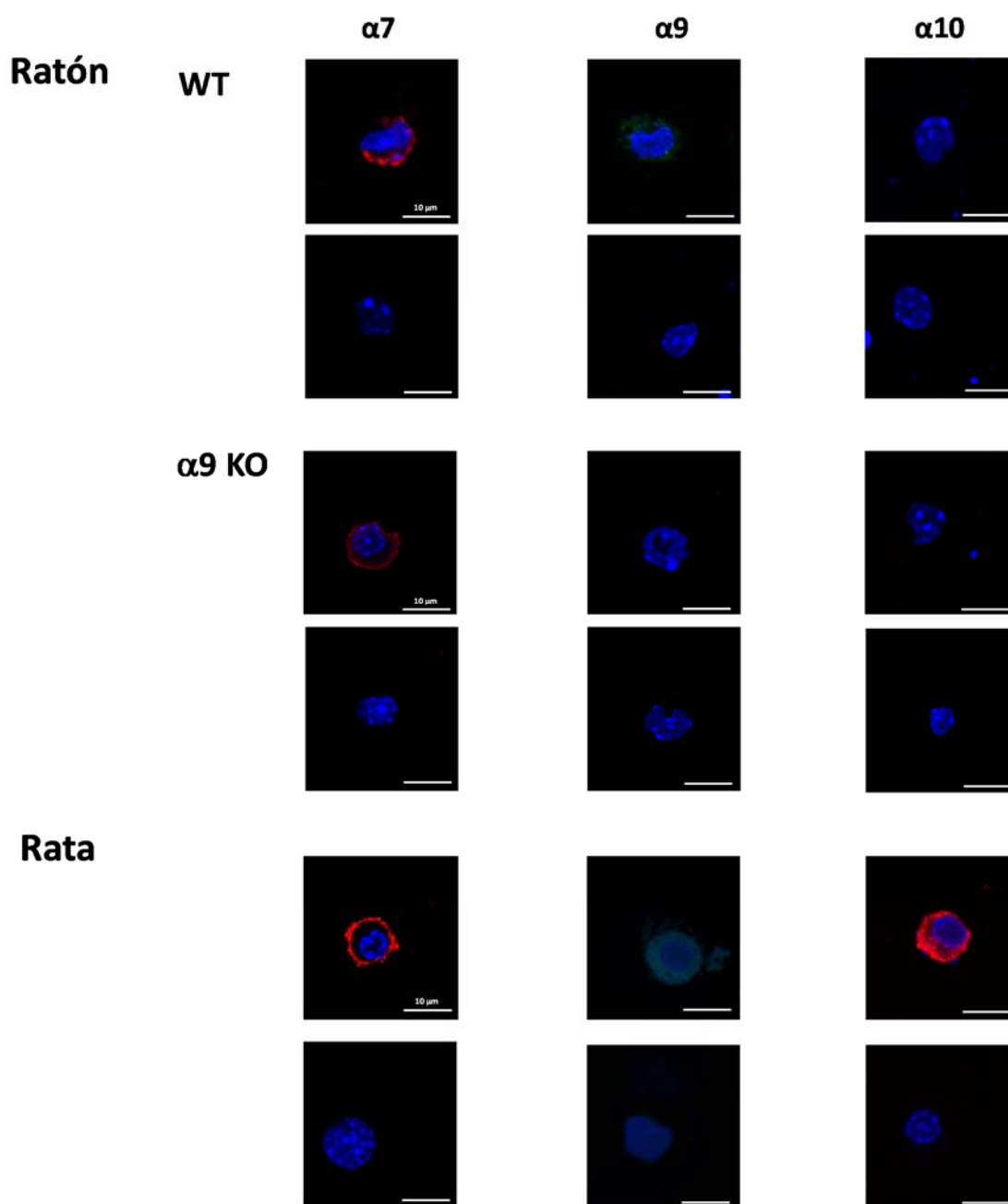


Figura 4.2. Inmunolocalización de las subunidades $\alpha 7$, $\alpha 9$ y $\alpha 10$ en células cromafines de ratón y rata en cultivo. *Paneles superiores.* Imágenes confocales del marcaje de las subunidades $\alpha 7$, $\alpha 9$ y $\alpha 10$ en tres células cromafines de ratón CBA CaJ *wild type* (WT) y los correspondientes controles negativos realizados en ausencia de anticuerpos primarios en otras tres células. *Paneles centrales.* Imágenes correspondientes al inmunomarcaje de las subunidades $\alpha 7$, $\alpha 9$ y $\alpha 10$ en células cromafines de ratón $\alpha 9$ KO y sus respectivos controles negativos. *Paneles inferiores.* Imágenes correspondientes al inmunomarcaje de las subunidades $\alpha 7$, $\alpha 9$ y $\alpha 10$ en célula cromafín de rata junto a sus controles negativos.

La **figura 4.2** muestra los resultados obtenidos en células cromafines de ratón CBA CaJ (WT; paneles superiores), ratón $\alpha 9$ KO (paneles centrales) y de rata (paneles inferiores). Estos últimos sirvieron como controles positivos, ya que en las células cromafines de esa especie animal se expresan las tres subunidades de los nAChRs (Solís-Garrido, 2006; Olivos-Oré, 2009; Colomer y

col., 2010). El inmunomarcaje correspondiente a la subunidad $\alpha 7$ se localiza preferentemente en la membrana plasmática de las células de los tres tipos de animales estudiados. Por otra parte, el marcaje de las subunidades $\alpha 9$ y $\alpha 10$ se distribuye por todo el citosol de las células cromafines de rata. En consonancia con los resultados obtenidos mediante genotipado así como de los provenientes de la literatura (Wu y col., 2010), no se detectó inmunorreactividad para la subunidad $\alpha 9$ en las células cromafines de ratón $\alpha 9$ KO, mientras que en ninguna de las cepas de ratón pudo constatarse inmunomarcaje de la subunidad $\alpha 10$.

La administración de ACh (100 μ M, 250 ms) a células cromafines en cortes de la glándula adrenal de animales control indujo corrientes iónicas con amplitud máxima de 297 ± 70 pA, que fueron inhibidas un $30 \pm 6\%$ ($P < 0,0001$; 216 ± 64 pA; $n = 7$) por el tratamiento con α -RgIA (200 nM) (**Figura 4.3A**). En ratones $\alpha 9$ KO se observó una marcada disminución de la magnitud de las corrientes inducidas por ACh, que alcanzaron valores máximos de 64 ± 4 pA ($n = 10$). Esta disminución no fue el resultado de un menor tamaño de las células cromafines de estos animales ya que la capacidad media de su membrana ($10,99 \pm 1,9$ pF; $n = 10$) no difirió significativamente de la medida en las células de los animales control ($11,4 \pm 0,5$ pF; $n = 4$). Es de destacar que en ratones $\alpha 9$ KO la incubación con α -RgIA (200 nM) no produjo reducción alguna (incremento del $12 \pm 3\%$; $P = 0,005$) de la amplitud de las corrientes inducidas por ACh (69 ± 4 pA; $n = 10$) (**Figura 4.3B**). Análogamente, la α -RgIA careció de efecto sobre las corrientes inducidas por dos agonistas nicotínicos capaces de activar los nAChRs $\alpha 9^*$, como son la Cho y la Oxo-M. Así, la amplitud de las corrientes inducidas por Cho (3 mM, 250 ms) fue de 49 ± 5 pA y de 54 ± 5 pA, antes y después del tratamiento con α -RgIA ($n = 9$), respectivamente. Por su parte, las corrientes activadas por Oxo-M (300 μ M, 250 ms) alcanzaron valores de 17 ± 1 pA y 19 ± 1 pA en ausencia y en presencia, respectivamente, de α -RgIA ($n = 4$) (**Figura 4.3C y D**). Nuestros resultados indican que la expresión de la subunidad $\alpha 9$ de los nAChRs resulta necesaria para que se manifiesten los efectos inhibidores de la α -RgIA sobre las corrientes nicotínicas en las células cromafines de la médula adrenal del ratón.

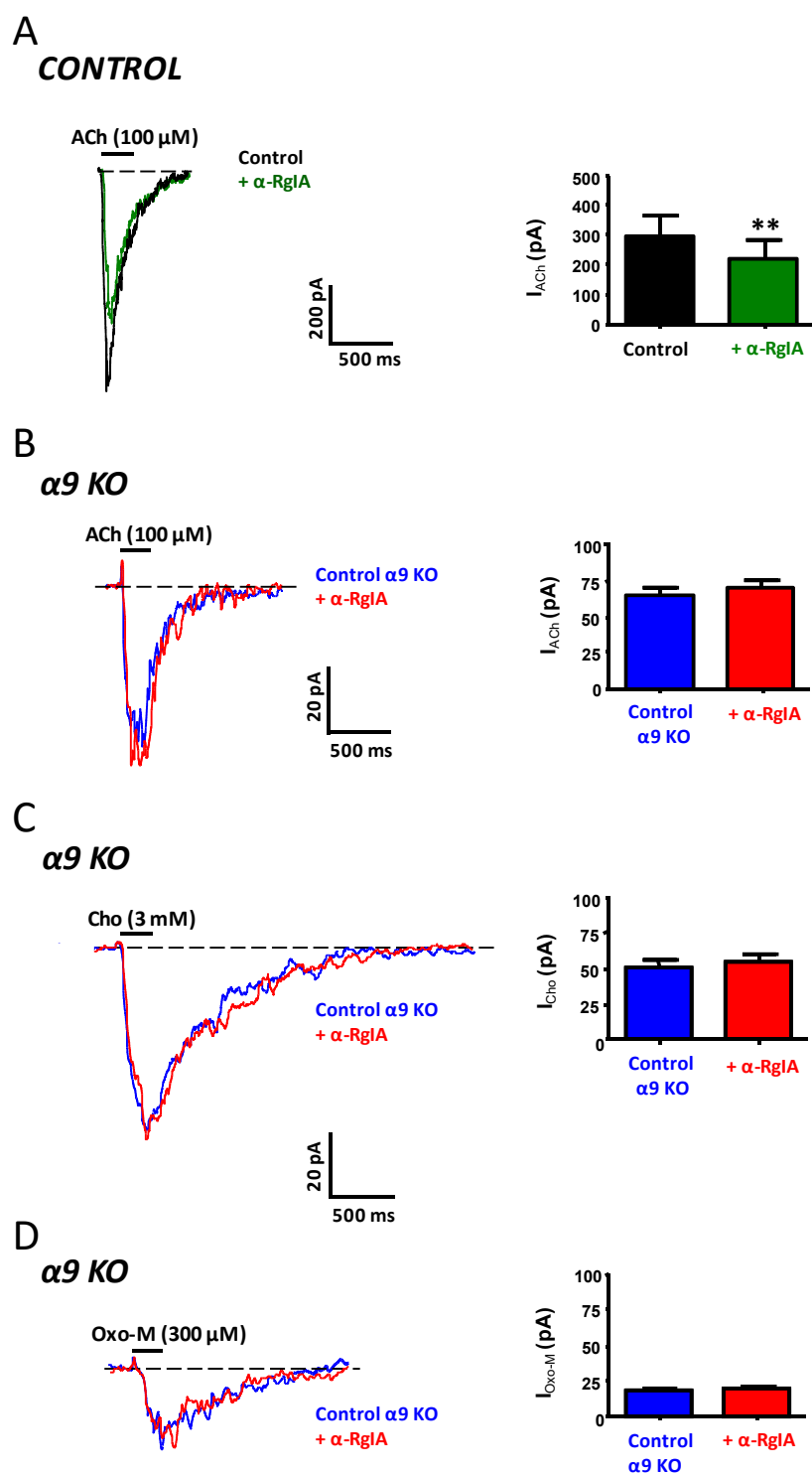


Figura 4.3. Efecto de la α -RgIA sobre las corrientes inducidas por ACh, Cho u Oxo-M en células cromafines en cortes de la glándula adrenal de ratones $\alpha 9$ KO y sus controles. **A.** Registro representativo y diagrama de barras del efecto bloqueante de la α -RgIA (200 nM) sobre las corrientes inducidas por ACh (100 μ M, 250 ms) en células cromafines de animales control ($n = 7$). **B.** Registro representativo y diagrama de barras del efecto de la α -RgIA (200 nM) sobre las corrientes inducidas por ACh (100 μ M, 250 ms) en células cromafines de animales $\alpha 9$ KO ($n = 10$). **C.** Registro representativo y diagrama de barras del efecto de la α -RgIA (200 nM) sobre las corrientes inducidas por Cho (3 mM, 250 ms) en células cromafines de animales $\alpha 9$ KO ($n = 9$). **D.** Registro representativo y diagrama de barras del efecto de la α -RgIA (200 nM) sobre las corrientes inducidas por Oxo-M (300 μ M, 250 ms) en células cromafines de animales $\alpha 9$ KO ($n = 4$). $V_h = -70$ mV. **, $P < 0,01$ con respecto a la condición control, en ausencia de α -RgIA.

Así mismo, y en razón de las similitudes estructurales y funcionales entre las subunidades $\alpha 7$ y $\alpha 9$ de los nAChRs, decidimos evaluar el efecto de la α -ArIB, un antagonista selectivo de los nAChRs $\alpha 7$, sobre las corrientes nicotínicas de las células cromafines de la médula adrenal de ratón. El tratamiento con α -ArIB (50 nM) produjo una reducción del $18,7 \pm 4 \%$ ($P = 0,002$; $n = 3$) de la amplitud máxima (desde 448 ± 124 pA hasta 372 ± 118 pA) de las corrientes inducidas por ACh (100 μ M, 250 ms) en células cromafines en cortes de la glándula adrenal de animales control (**Figura 4.4A**). En células provenientes de animales $\alpha 9$ KO, la incubación con α -ArIB (50 nM) produjo una mínima reducción ($2,7 \pm 2\%$) de la amplitud máxima (desde 75 ± 13 pA hasta 73 ± 9 pA; $n = 5$) de las corrientes originadas por la administración de Cho (3 mM, 250 ms) un agonista de los nAChRs $\alpha 7^*$ y $\alpha 9^*$ (**Figura 4.4B**). En consonancia con el mínimo efecto de α -ArIB, indicativo de una reducida expresión de nAChRs $\alpha 7^*$ funcionales, la administración de PNU282987 (30 μ M, 1 s), no originó corriente alguna en las células cromafines de los animales $\alpha 9$ KO, tanto cuando se administró de forma aislada como cuando se aplicó en presencia del modulador alostérico PNU120596 (1 μ M) ($n = 4$) (**Figura 4.5A**). En conjunto, estos resultados sugieren que la subunidad $\alpha 9$ es un constituyente esencial de los nAChRs de las células cromafines de ratón y que su ausencia no se ve compensada por la expresión de otros nAChRs funcionales. Además, la subunidad $\alpha 7$, cuya expresión en las células cromafines de los animales $\alpha 9$ KO ha sido confirmada mediante inmunotransferencia (resultados no mostrados), no constituiría nAChRs $\alpha 7$ homoméricos ni formaría parte de otros nAChRs funcionales en ausencia de la subunidad $\alpha 9$. Curiosamente, las subunidades $\alpha 7$ de las células cromafines de los animales control tampoco formarían nAChRs $\alpha 7$ homoméricos a tenor de la incapacidad del PNU282987, solo o en combinación con el PNU120596, para inducir corrientes a través de la membrana de las células cromafines de estos animales (**Figura 4.5B**). Este hallazgo y la reducida conductancia iónica de los nAChRs $\alpha 9$ homoméricos observada en otras preparaciones, nos llevó a investigar la existencia en este modelo experimental de nAChRs formados por las subunidades $\alpha 9$ y $\alpha 7$, sensibles tanto a la α -ArIB como a la α -RgIA. La coadministración de ambas toxinas a las concentraciones de 50 nM (α -ArIB) y 200 nM (α -RgIA) redujo la amplitud de las corrientes inducidas por ACh (100 μ M, 50 ms) un $19,2 \pm 2\%$ (desde 272 ± 105 pA hasta 222 ± 90 pA; $P = 0,0004$; $n = 5$) (**Figura 4.6**). Este porcentaje es similar o inferior a los observados cuando la α -ArIB y la α -RgIA se administran por separado, lo que sugiere que ambas toxinas actuarían sobre una misma población de nAChRs, que presumiblemente estarían formados por las subunidades $\alpha 7$ y $\alpha 9$. Adicionalmente, estos resultados indican que la fracción de nAChRs $\alpha 9$ homoméricos de las células cromafines de ratón sería mínima o inexistente.

Los principales resultados relacionados en la farmacología colinérgica de las células cromafines en cortes de la glándula adrenal del ratón aparecen tabulados en el ANEXO I.

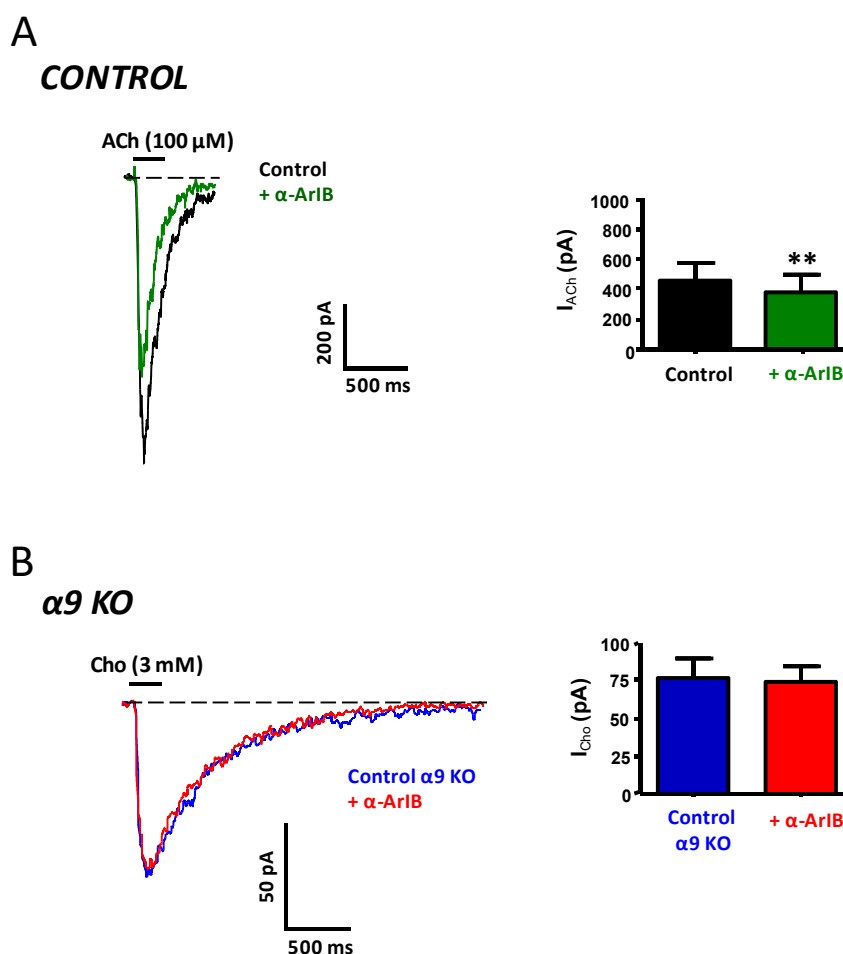


Figura 4.4. Efecto de la α -ArIB sobre las corrientes nicotínicas de las células cromafines en cortes de la glándula adrenal de ratón. **A.** Registro representativo y diagrama de barras del efecto bloqueante de la α -ArIB (50 nM) sobre las corrientes inducidas por ACh (100 μ M, 250 ms) en células cromafines de animales control ($n = 3$). **B.** Registro representativo y diagrama de barras del efecto de la α -ArIB (50 nM) sobre las corrientes inducidas por Cho (3 mM, 250 ms) en las células cromafines de animales $\alpha 9$ KO ($n = 5$). $V_h = -70$ mV. **, $P < 0,01$ con respecto a la condición control, en ausencia de α -ArIB.

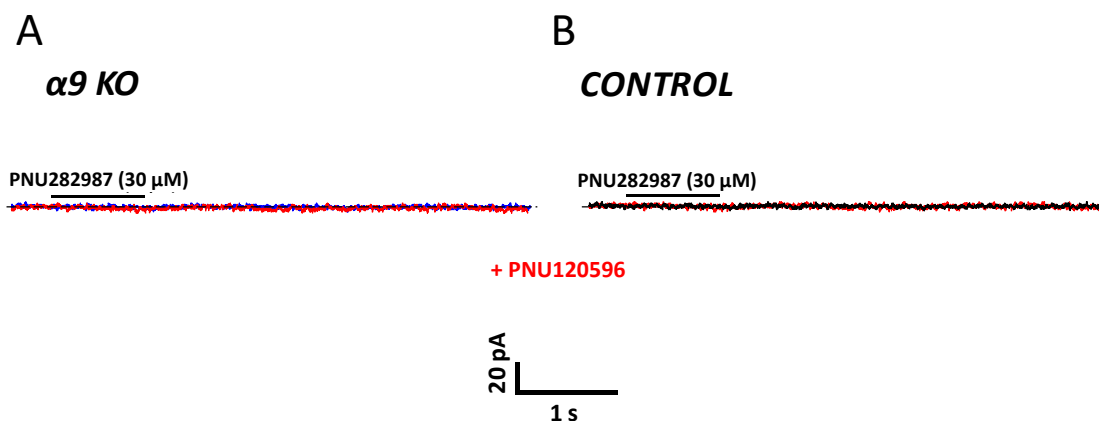


Figura 4.5. Efecto del PNU282987, en ausencia o en presencia de PNU120596, sobre las corrientes de la membrana de las células cromafines en cortes de la glándula adrenal de ratón. **A.** Registro representativo del efecto de la administración de PNU282987 (30 μ M, 1 s) en ausencia (trazo azul) o en presencia (trazo rojo) de PNU120596 (1 μ M) sobre las corrientes de la membrana de las células cromafines de animales $\alpha 9$ KO ($n = 4$). **B.** Registro representativo del efecto de la administración de PNU282987 (30 μ M, 1 s), en ausencia (trazo negro) o en presencia (trazo rojo) de PNU120596 (1 μ M) sobre las corrientes de las células cromafines de animales control ($n = 2$). $V_h = -70$ mV.

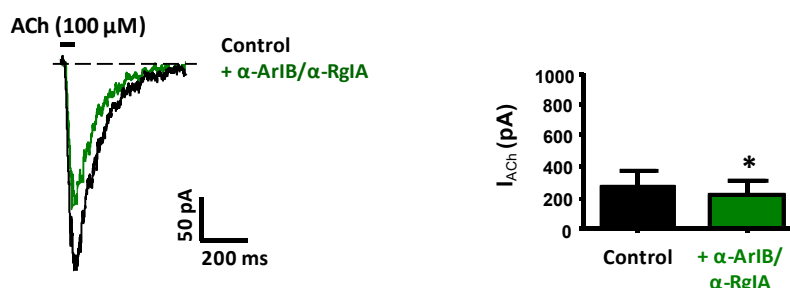


Figura 4.6. Efecto de la administración conjunta de α -ArIB y α -RgIA sobre las corrientes nicotínicas de las células cromafines en cortes de la glándula adrenal de ratón. Registro representativo y diagrama de barras del efecto bloqueante de la administración de α -ArIB (50 nM) y α -RgIA (200 nM) sobre las corrientes inducidas por ACh (100 μ M, 50 ms) en células cromafines de animales control (n = 5). V_h = - 70 mV. *, $P < 0,05$ con respecto a la condición control, en ausencia de α -ArIB y α -RgIA.

4.1.3. Efecto de la α -conotoxina RgIA sobre las corrientes nicotínicas de las neuronas de los ganglios de las raíces dorsales de la médula espinal de la rata

Las neuronas DRG de la médula espinal constituyen un modelo particularmente interesante para el estudio de la selectividad farmacológica de la α -RgIA. Estas neuronas expresan ARNm de una amplia variedad ($\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\alpha 7$, $\alpha 9$, $\alpha 10$, $\beta 2$, $\beta 3$ y $\beta 4$) de subunidades de los nAChRs (Lips y col., 2002; Callaghan y Adams, 2010), si bien algunos estudios no han podido confirmar la presencia de la $\alpha 9$ (Haberberger y col., 2004; Hone y col., 2012). Por otra parte, se trata de una población celular heterogénea tanto desde el punto de vista de su morfología (difieren en su tamaño), de su sensibilidad farmacológica (presentan un importante variabilidad intercelular en la respuesta a ACh, ATP o capsaicina) y de la modalidad sensitiva (térmica, mecánica, nociceptiva, etc.) de la que transmiten información al SNC. En el presente trabajo hemos empleado cultivos celulares de los ganglios de la región lumbar (L1-L6) de ratas SD adultas (mayores de 8 semanas). Experimentos de inmunotransferencia (resultados no mostrados) y de inmunocitoquímica basados en el empleo de anticuerpos específicos confirmaron la presencia de las proteínas de las subunidades $\alpha 7$ y $\alpha 10$ pero no de la $\alpha 9$ en dichos cultivos (Figura 4.7).

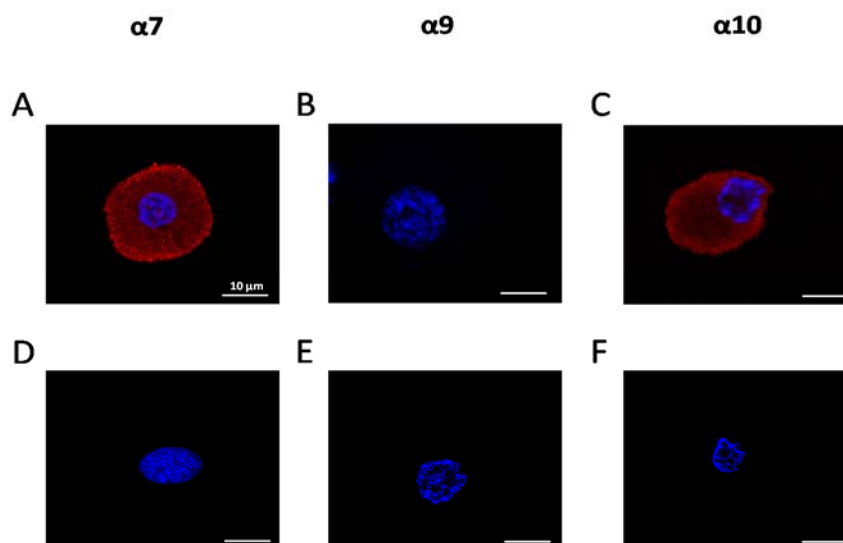


Figura 4.7. Inmunolocalización de las subunidades $\alpha 7$, $\alpha 9$ y $\alpha 10$ en neuronas de los ganglios de las raíces dorsales de la médula espinal de la rata en cultivo. Imágenes confocales del marcaje de las subunidades $\alpha 7$, $\alpha 9$ y $\alpha 10$ en tres neuronas de los ganglios de las raíces dorsales de la médula espinal y los correspondientes controles negativos realizados en ausencia de anticuerpos primarios en otras tres neuronas.

Los cultivos de neuronas DRG fueron caracterizados funcionalmente mediante análisis de imagen de los incrementos de la concentración citosólica de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) inducidos por la despolarización de la membrana con alto K^+ (30 mM) y la administración sucesiva de ACh (100 μM), ATP (100 μM) y capsaicina (10 μM). Solo se analizaron las respuestas a los fármacos agonistas en aquellas células que respondieron a la administración de alto K^+ con un incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, indicativo de su naturaleza neuronal. La **figura 4.8** muestra registros representativos obtenidos en una preparación de neuronas DRGs estimuladas con los tres compuestos mencionados. Solo el $34 \pm 7\%$ (114 de 337 células analizadas, pertenecientes a 4 cultivos) de estas neuronas respondieron a la administración de ACh con incrementos de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. De este 34%, el $86 \pm 7\%$ y el $55 \pm 9\%$ respondieron también a la estimulación con ATP (100 μM , 30 s) o capsaicina (10 μM , 30 s) con elevaciones de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, lo que unido a un diámetro de sus somas comprendido entre 20 y 40 μm sugiere el carácter nociceptivo de buena parte de ellas.

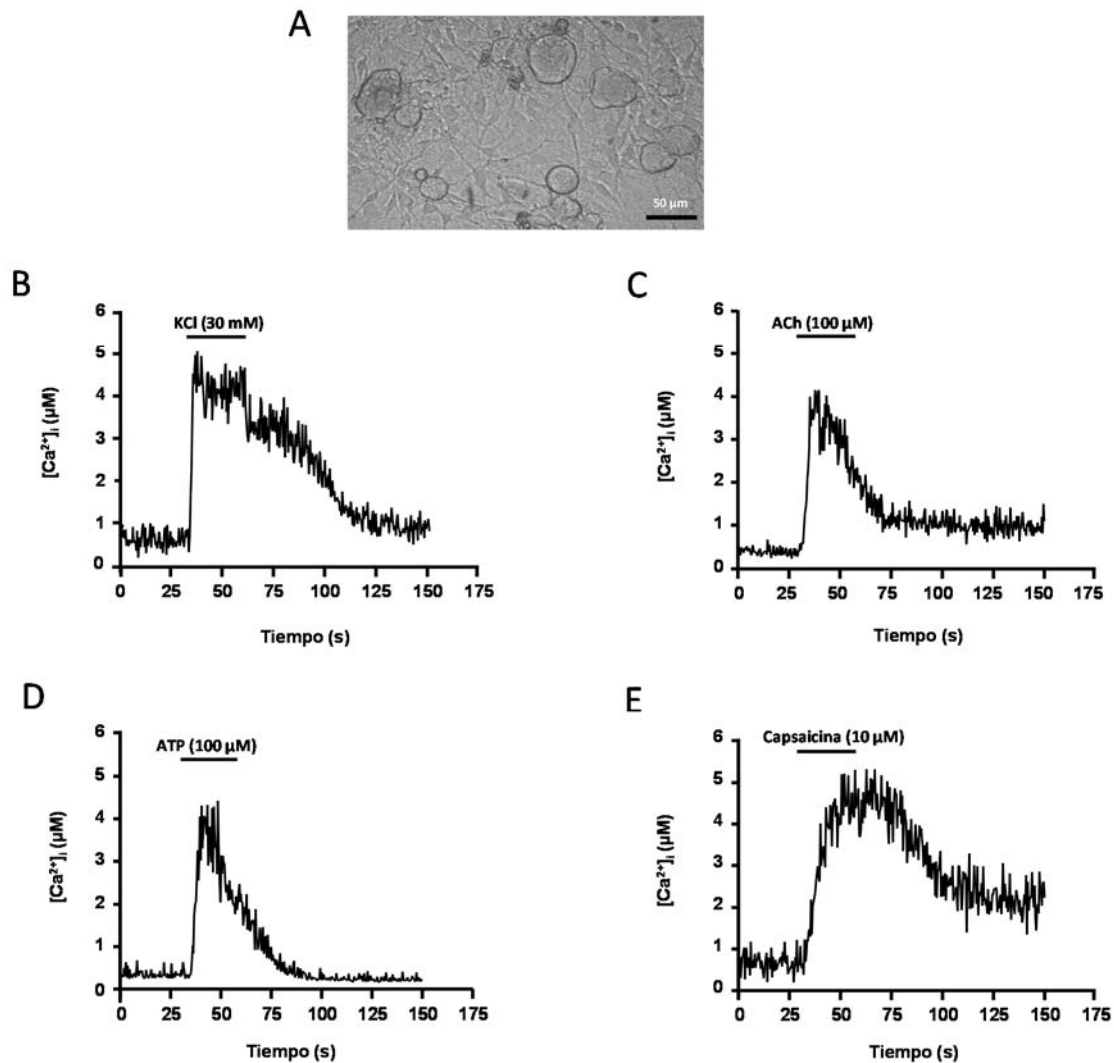


Figura 4.8. Caracterización funcional de neuronas DRG de rata. **A.** Imagen de campo claro de un cultivo de células DRGs. **B.** Registro representativo del incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por la administración de alto K^+ (30 mM, 30 s) en una neurona DRG. **C.** Registro representativo del incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por la administración de ACh (100 µM, 30 s) en una neurona DRG. **D.** Registro representativo del incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por la administración de ATP (100 µM, 30 s) en una neurona DRG. **E.** Registro representativo del incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por la administración de capsaicina (10 µM, 30 s) en una neurona DRG. Los registros mostrados en B-D fueron obtenidos en la misma célula.

El efecto de la α -RgIA fue evaluado sobre las respuestas de corriente inducidas por ACh en células con diámetros de 20-40 µm (valor medio de la capacidad de la membrana celular de 84 ± 24 pF; $n = 13$), similares a los de las neuronas que exhibían respuestas de elevación de la $[Ca^{2+}]_i$ tras la estimulación con ACh. La administración de ACh (100 µM, 500 ms) indujo corrientes de entrada en el 35% de las células (13 de 37 células estudiadas), en las que alcanzaron amplitudes máximas de 713 ± 121 pA. Como cabría esperar de un tipo celular que expresa la subunidad $\alpha 7$, la incubación con α -ArIB (50 nM) redujo un $34 \pm 8\%$ la amplitud de las corrientes inducidas por ACh (las amplitudes máximas fueron de 771 ± 155 pA y de 491 ± 106 pA, antes y después, respectivamente,

del tratamiento con α -ArlB; $P = 0,0004$; $n = 6$) (**Figura 4.9A**). Igualmente esperable fue el hecho de que la administración subsiguiente de α -RgIA (200 nM) no produjera un efecto inhibitor adicional al observado en presencia de α -ArlB (la amplitud máxima de la corriente fue de 476 ± 102 pA tras la incubación con α -ArlB y α -RgIA). Sin embargo, la administración de α -RgIA (200 nM) en células que no habían sido tratadas previamente con α -ArlB produjo una inhibición del $34 \pm 4\%$ ($P < 0,0001$) de la amplitud de las corrientes inducidas por ACh (amplitudes máximas de 675 ± 187 pA y de 404 ± 103 pA, antes y después, respectivamente, del tratamiento con α -RgIA; $P < 0,0001$; $n = 7$). Algo menos sorprendente fue el hecho de que la administración de α -ArlB en presencia de α -RgIA solo produjera una pequeña inhibición ($5 \pm 3\%$; la amplitud de la corriente en presencia de α -RgIA y α -ArlB fue de 347 ± 75 pA; $n = 7$) sobre la previamente producida por α -RgIA (**Figura 4.9B**). Es de destacar que las neuronas DRG mostraron un comportamiento particularmente heterogéneo en la respuesta a la α -ArlB tras el tratamiento con α -RgIA. Así, en 5 de las células analizadas no se observó reducción alguna de la corriente (400 ± 192 pA, oclusión completa del efecto de la α -ArlB), mientras que en las 2 restantes se produjo una inhibición del $15 \pm 2\%$ (325 ± 88 pA).

Estos resultados sugieren que la presencia de la subunidad $\alpha 9$ no es una condición necesaria para el efecto bloqueante de la α -RgIA, al tiempo que nuevamente muestran la oclusión recíproca de los efectos de α -RgIA y α -ArlB, lo que sugiere que dichas toxinas podrían actuar sobre un nAChR común y que en esta preparación sería el heteromérico formado por la combinación de las subunidades $\alpha 7$ y $\alpha 10$. Por otra parte, nuestros resultados no excluyen la existencia de nAChRs $\alpha 7$ homoméricos en las neuronas DRG de la rata, en consonancia con lo descrito por otros autores (Genzen y col., 2001; Rau y col., 2005; Hone y col., 2012).

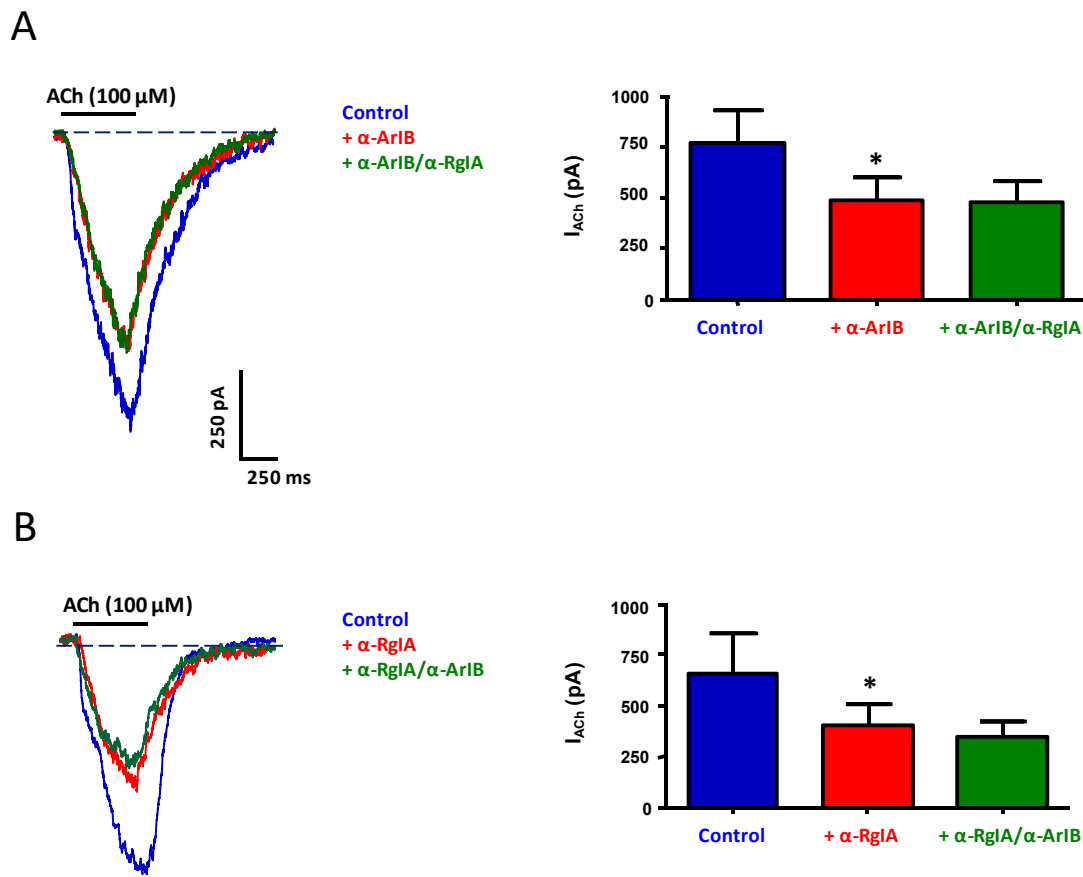


Figura 4.9. Oclusión recíproca de los efectos bloqueantes de la α -RgIA y de la α -ArIB sobre las corrientes inducidas por ACh en neuronas DRG de rata. **A.** Registro representativo y diagrama de barras del efecto bloqueante de la α -ArIB (50 nM) sobre las corrientes inducidas por ACh (100 μ M, 500 ms) y de la oclusión del efecto de la α -RgIA (200 nM) cuando es posteriormente administrada junto con la α -ArIB ($n = 6$). **B.** Registro representativo y diagrama de barras del efecto bloqueante de la α -RgIA (200 nM) sobre las corrientes inducidas por ACh (100 μ M, 500 ms) y de la oclusión del efecto de la α -ArIB (50 nM) cuando es posteriormente administrada junto con la α -RgIA ($n = 7$). $V_h = -70$ mV. *, $P < 0,05$ con respecto al control.

4.1.4. Efecto de la α -conotoxina RgIA sobre las corrientes de Ca^{2+} , Na^+ y K^+ dependientes de voltaje y los canales SK de las células cromafines de la médula adrenal de la rata

En la literatura científica se ha producido una controversia acerca de la capacidad de la α -RgIA para inhibir las corrientes iónicas a través de los canales Ca_v de tipo N (Callaghan y col., 2008; McIntosh y col., 2009; Callaghan y Adams, 2010). Dicho efecto estaría mediado por receptores $GABA_B$ que serían activados por la α -RgIA. Al objeto de arrojar luz sobre esta cuestión y, al tiempo, poder descartar que los efectos de la α -RgIA sobre la actividad eléctrica de las células cromafines de la glándula adrenal pudieran deberse a una interacción con canales iónicos distintos a los nAChRs, decidimos evaluar los efectos de esta toxina sobre las principales conductancias dependientes de voltaje y/o de Ca^{2+} de la membrana de este tipo celular. El registro de las corrientes a través de canales Ca_v se llevó a cabo en células cromafines dializadas con una solución intracelular

suplementada con 10 mM EGTA, en la que el K^+ fue sustituido por Cs^+ , y superfundidas con una solución que contenía 2 mM de Ca^{2+} . La despolarización de la membrana celular (+10 mV, 300 ms) indujo corrientes de entrada rápidamente inactivantes seguidas por otras de carácter sostenido, debidas a la activación, respectivamente, de canales Na_v y Ca_v . La administración de α -RgIA (100 nM) no modificó la amplitud de las corrientes de Ca^{2+} (amplitudes de 139 ± 64 pA y de 155 ± 86 pA, antes y después, respectivamente, del tratamiento con α -RgIA; $n = 3$), si bien redujo de forma significativa la amplitud de las corrientes inducidas por ACh (100 μ M) en las mismas células (**Figura 4.10**). Los resultados obtenidos en células dializadas con una solución intracelular rica en Cs^+ sugerían también que la α -RgIA no modifica la amplitud de las corrientes de Na^+ dependientes de voltaje (1.499 ± 265 pA y 1.494 ± 265 pA, en ausencia y en presencia, respectivamente, de α -RgIA; $n = 3$), idea ésta que fue corroborada en células dializadas con soluciones ricas en K^+ . En estas condiciones, la despolarización de la membrana (+10 mV, 300 ms) indujo corrientes de entrada rápidamente inactivantes con amplitud máxima de 1.488 ± 266 pA ($n = 4$), debidas a la activación de canales Na_v , y corrientes de salida lentamente inactivantes debidas al flujo de K^+ y que mostraron una amplitud máxima de 1.039 ± 286 pA ($n = 4$). La administración de α -RgIA no modificó la amplitud (1.641 ± 240 pA y 1.216 ± 356 pA, respectivamente para las corrientes de Na^+ y de K^+) ni el curso temporal de las mismas, lo cual no fue óbice para que inhibiera las inducidas por ACh (100 μ M) en las mismas células (**Figuras 4.10 y 4.11**). Estos resultados indican que la α -RgIA no modificaría la actividad eléctrica de las células cromafines de la rata como resultado de un efecto sobre las conductancias iónicas activadas por voltaje de la membrana celular. Entre ellas se encontraría también la dependiente de los canales BK, que contribuyen de forma mayoritaria a la salida de K^+ al potencial de +10 mV.

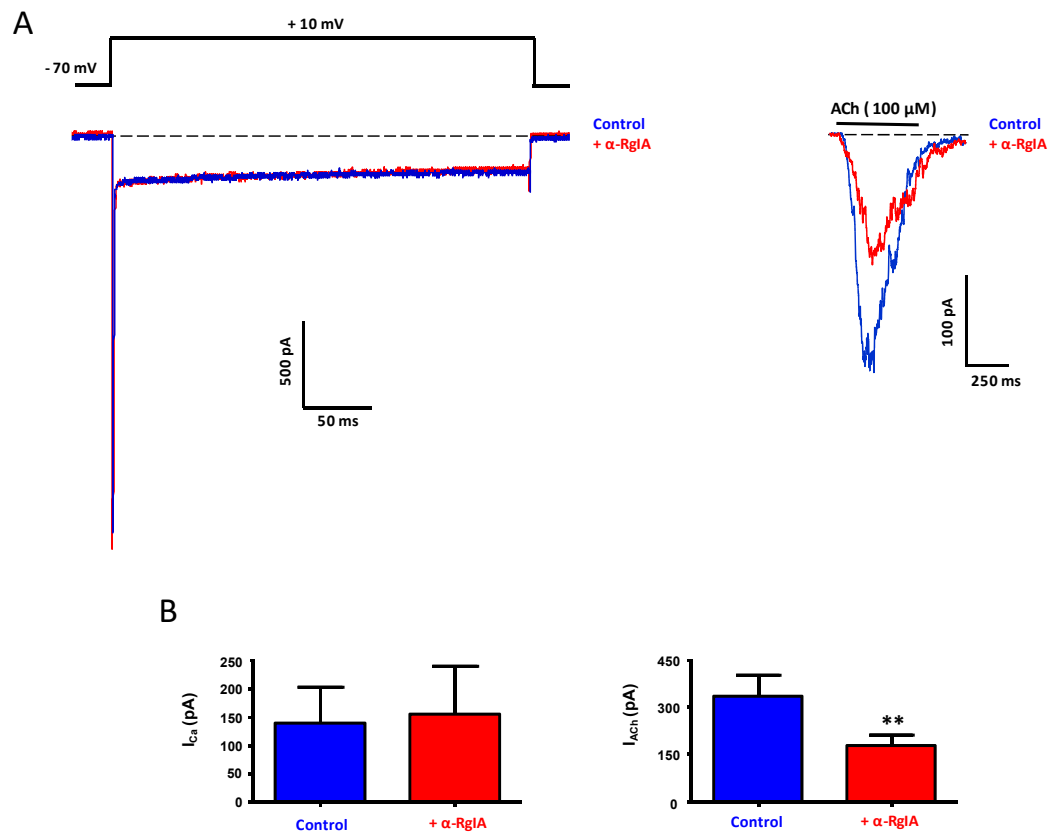


Figura 4.10. Efecto de la α -RgIA sobre los canales Cav de las células cromafines aisladas de la médula adrenal de la rata. **A.** Registro representativo del efecto de la administración de α -RgIA (100 nM) sobre las corrientes iónicas inducidas por la despolarización de la membrana celular (+10 mV, 300 ms) o la administración de ACh (100 μ M, 500 ms). Para evidenciar la presencia de corrientes de Ca^{2+} se utilizó una solución intracelular conteniendo como principal catión Cs^+ , que bloquea los canales de K^+ . $V_h = -70$ mV. **B.** Diagrama de barras del efecto de la α -RgIA (100 nM) sobre las corrientes a través de los canales Cav y los nAChRs ($n = 3$). La amplitud de las corrientes de Ca^{2+} fue valorada al final del pulso despolarizante, inmediatamente antes de retornar al V_h . **, $P < 0,01$ con respecto al control.

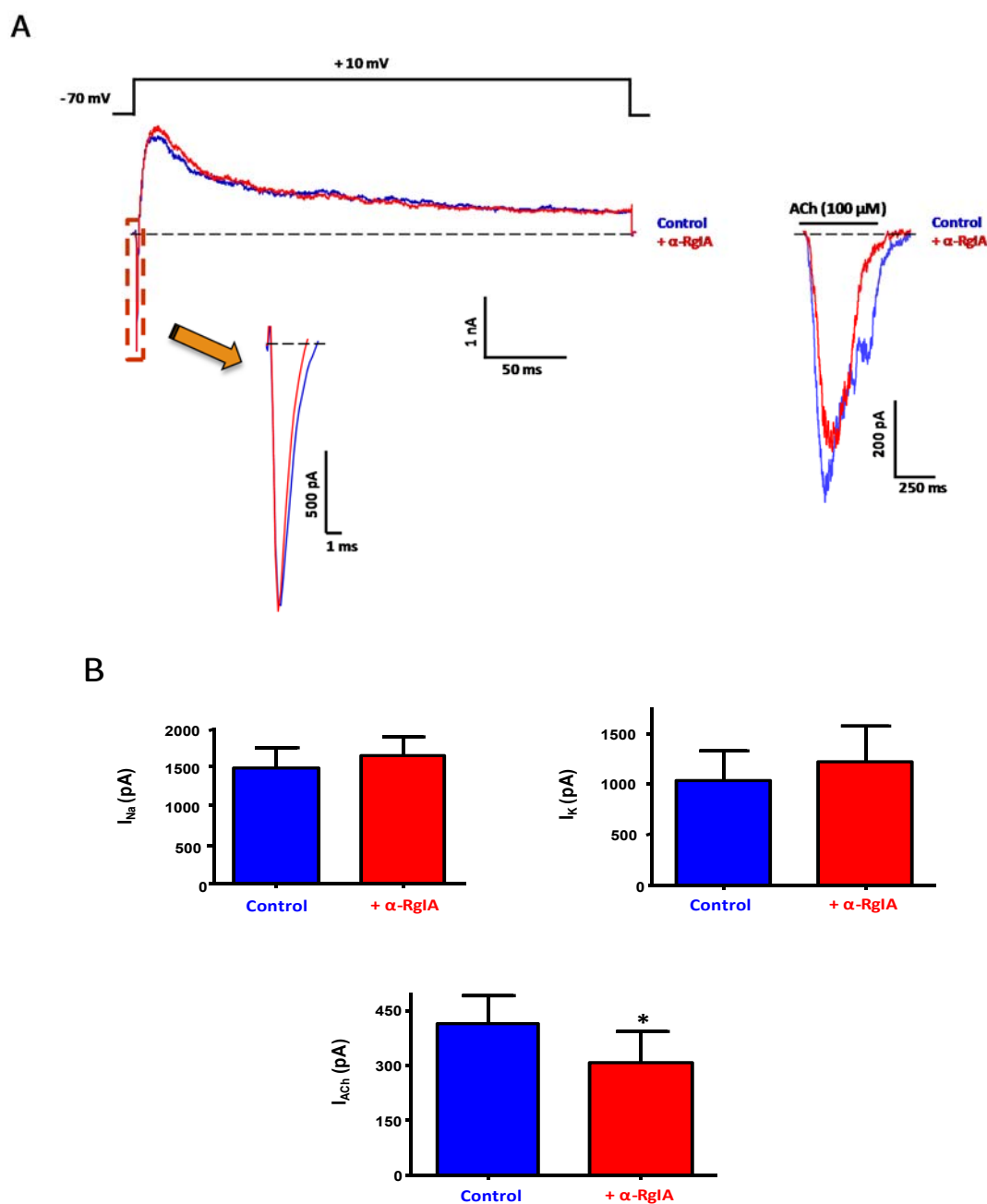


Figura 4.11. Efecto de la α -RgIA sobre las corrientes de Na^+ y K^+ activadas por la despolarización de la membrana de las células cromafines aisladas de la médula adrenal de rata. **A.** Registro representativo del efecto de la administración de α -RgIA (100 nM) sobre las corrientes iónicas inducidas por la despolarización de la membrana (+10 mV, 300 ms) o la administración de ACh (100 μM , 500 ms). En la parte inferior izquierda de la figura se muestran a escala ampliada las corrientes de Na^+ dependientes de voltaje. $V_h = -70 \text{ mV}$. **B.** Diagrama de barras del efecto de la α -RgIA (100 nM) sobre corrientes de Na^+ y de K^+ activadas por la despolarización de la membrana y las mediadas por nAChRs ($n = 4$). *, $P < 0,05$ con respecto al control.

Las células cromafines de rata presentan una elevada expresión de canales SK capaces de permanecer activados a potenciales de membrana negativos (Marty, 1981; Neely y Lingle, 1992; Artalejo y col., 1993; Park, 1994). Con el fin de inducir una elevación de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ capaz de activarlos de forma prolongada aplicamos un pulso despolarizante de larga duración (400 ms, +10 mV) que fue

seguido de un periodo de 400 ms de repolarización parcial a -40 mV antes de retornar al V_h de -70 mV. La amplitud de las corrientes SK se midió en el tramo final de la fase a -40 mV, una vez que se hubieran desactivado las conductancias de K^+ dependientes de voltaje de la membrana celular. La administración de α -RgIA (100 nM) no modificó la amplitud de las corrientes SK (24 ± 7 pA y 26 ± 7 pA, en ausencia y presencia, respectivamente, de α -RgIA; $n = 5$), que, sin embargo, se vio reducida en un $83 \pm 7\%$ (4 ± 2 pA) tras la administración de apamina (200 nM), un bloqueante selectivo de los canales SK (Banks y col., 1979) (**Figura 4.12**). Estos resultados, junto con los expuestos previamente en relación con los canales Ca_v , indicarían que la α -RgIA carece de efecto sobre los canales SK de las células cromafines de la glándula adrenal de la rata.

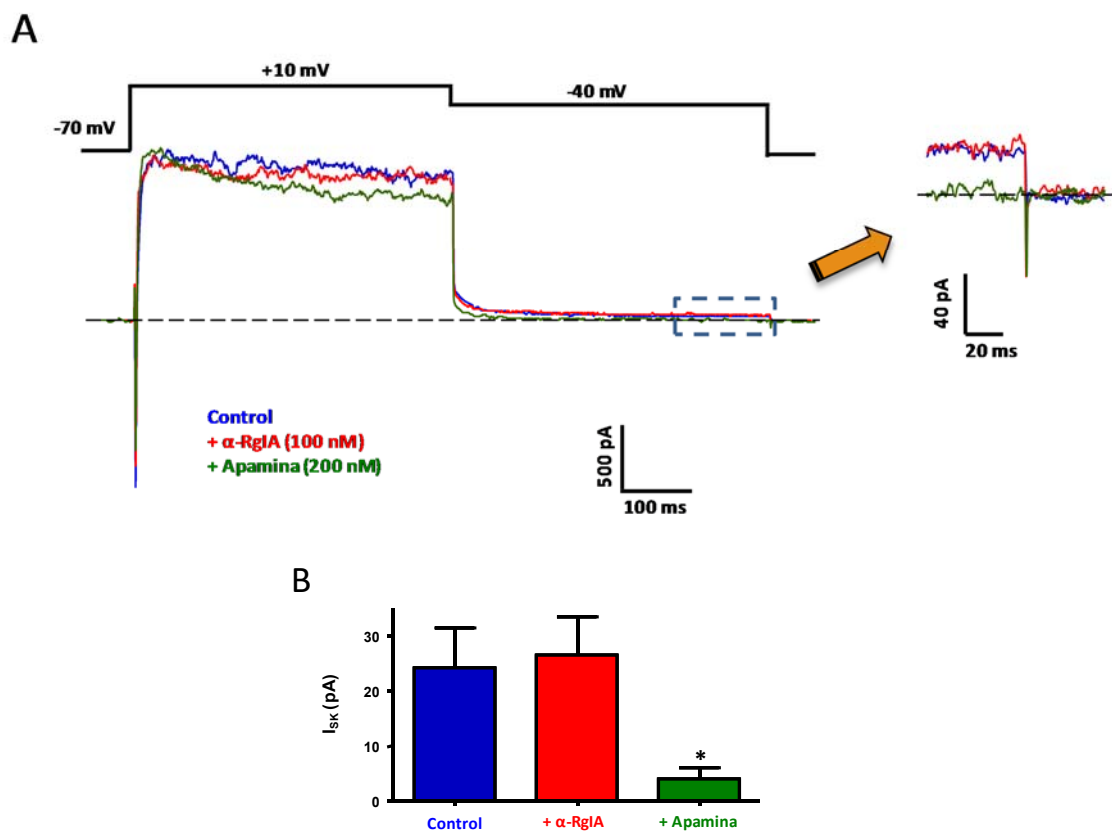


Figura 4.12. Efecto de la α -RgIA sobre los canales SK de la membrana de las células cromafines aisladas de la glándula adrenal de la rata. **A.** Registros representativos del efecto de la α -RgIA (100 nM) y de la apamina (200 nM) sobre las corrientes SK activadas por la entrada de Ca^{2+} inducida por la despolarización de la membrana celular hasta $+10$ mV (véase el protocolo de voltaje). La solución intracelular contiene como principal catión el K^+ , por lo que las corrientes de entrada de Ca^{2+} quedan ocultas por corrientes de salida de K^+ . En el panel de la derecha se muestran ampliados los registros de corriente comprendidos en el rectángulo de líneas discontinuas dibujado en el panel izquierdo, para una mejor ilustración de las corrientes de salida en el tramo final de la segunda fase (-40 mV) del protocolo de voltaje. $V_h = -70$ mV. **B.** Diagrama de barras del efecto de la α -RgIA y de la apamina sobre las corrientes a través de los canales SK de las células cromafines de la rata ($n = 5$). La amplitud de las corrientes SK fue determinada en el tramo final de la fase a -40 mV. * $P < 0,05$ con respecto a la situación control.

A fin de determinar una posible acción agonista de la α -RgIA sobre los receptores GABA_B, evidenciable mediante la inhibición de las corrientes de Ca²⁺ dependientes de voltaje, decidimos inicialmente evaluar los efectos del baclofeno, un agonista típico de los receptores GABA_B, sobre los canales Ca_v de las células cromafines de la rata (Tedford y Zamponi, 2006). En contraste con el efecto inhibitorio de dichos canales descrito en las células cromafines bovinas (Doroshenko y Neher, 1991), el baclofeno no modificó la amplitud de las corrientes de Ca²⁺ dependientes de voltaje en las células cromafines de la rata (la amplitud de las corrientes fue de 72 ± 9 pA y de 68 ± 10 pA, antes y después, respectivamente, del tratamiento con baclofeno; $n = 5$). Por el contrario, el baclofeno ($50 \mu\text{M}$) inhibió un $35 \pm 1\%$ (589 ± 157 pA y 382 ± 99 pA, antes y después, respectivamente, del tratamiento con baclofeno; $P < 0,0001$) la amplitud de las corrientes inducidas por ACh ($100 \mu\text{M}$; $n = 5$) (**Figura 4.13**). Estos resultados, al tiempo que descartarían la existencia de receptores GABA_B acoplados a la inhibición de los canales Ca_v en nuestra preparación, ponen de manifiesto una nueva diana farmacológica del baclofeno, los nAChRs. Por otra parte, también permitirían excluir que los efectos de la α -RgIA sobre la actividad eléctrica de las células cromafines de la médula adrenal de la rata pudieran estar mediados de forma indirecta –vía receptores GABA_B– por los canales Ca_v.

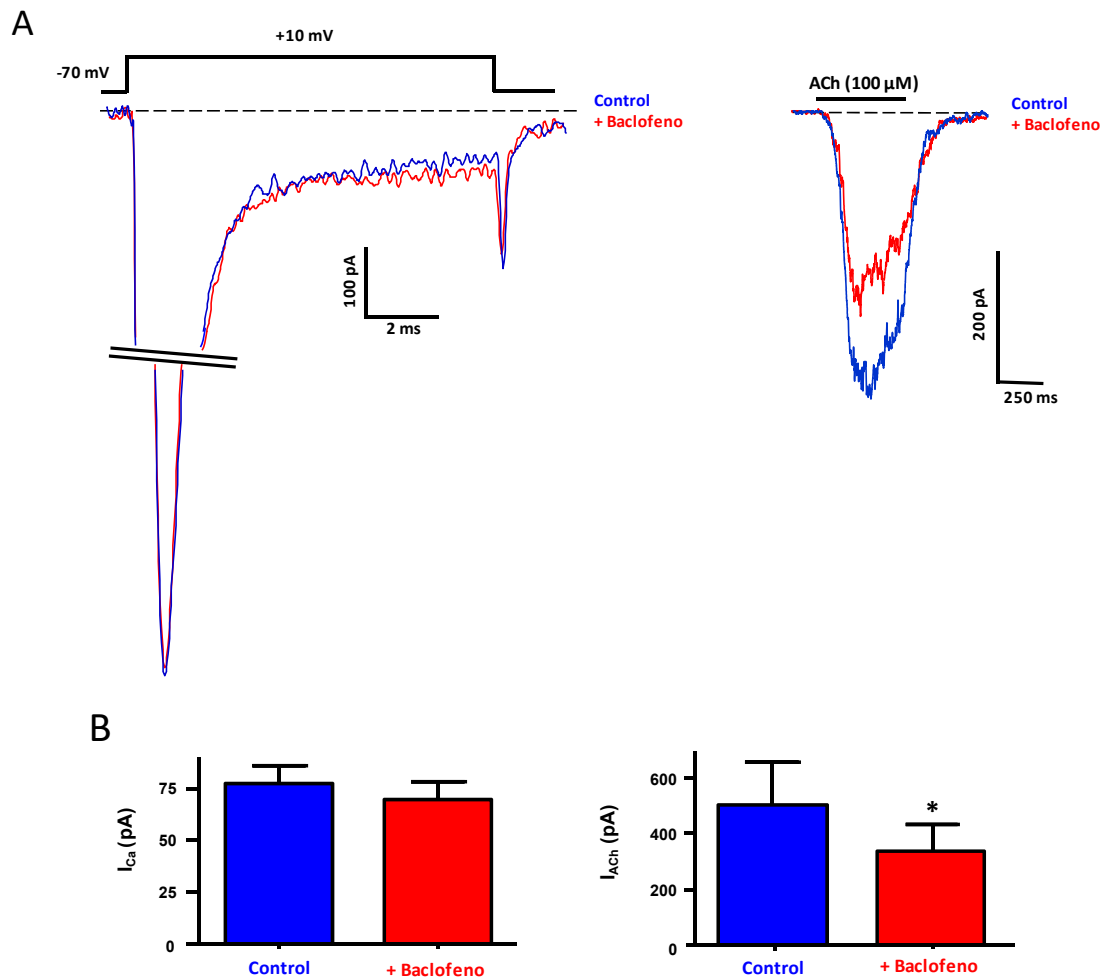


Figura 4.13. Efecto del baclofeno sobre los canales Ca_v y los nAChRs de las células cromafines aisladas de la médula adrenal de la rata. **A.** Registros representativos del efecto de la administración de baclofeno (50 μM) sobre las corrientes de Ca^{2+} activadas por la despolarización de membrana (+10 mV, 10 ms) o por la administración de ACh (100 μM, 500 ms). La solución intracelular contiene Cs^+ como principal catión. $V_h = -70$ mV. **B.** Diagramas de barras del efecto del baclofeno (50 μM) sobre las corrientes de Ca^{2+} dependientes de voltaje y las inducidas por ACh (100 μM) ($n = 5$). La amplitud de las corrientes de Ca^{2+} fue valorada al final del pulso despolarizante, inmediatamente antes de retornar al V_h . *, $P < 0,05$ con respecto al control.

4.1.5. Efecto de la α -conotoxina RgIA y del baclofeno sobre las corrientes de Ca^{2+} dependientes de voltaje de las neuronas de los ganglios de las raíces dorsales de la médula espinal de la rata

En vista de los resultados obtenidos en las células cromafines, procedimos a evaluar la actividad de la α -RgIA sobre los receptores GABA_B de las neuronas DRG, en las que está bien descrita la modulación gabérgica de los canales Ca_v . Para ello, las células fueron dializadas con una solución intracelular suplementada con 5 mM de EGTA en la que el K^+ fue sustituido por Cs^+ y superfundidas con una solución que contenía 140 mM de tetraetilamonio (TEA) y 5 mM de Ca^{2+} . La despolarización de la membrana celular (+10 mV, 300 ms) indujo corrientes de entrada lentamente

inactivantes, debidas a la activación de canales Ca_v . La administración de α -RgIA (100 nM) no modificó significativamente la amplitud de las corrientes de Ca^{2+} (amplitudes máximas de 4.028 ± 962 pA y de 4.251 ± 953 pA, antes y después, respectivamente, del tratamiento con α -RgIA; $n = 5$), si bien el baclofeno (50 μM) redujo la amplitud de las mismas en un $23 \pm 4\%$ (desde 4.251 ± 953 pA hasta 3.367 ± 805 pA; $P < 0,0001$; $n = 5$) (**Figura 4.14**). Estos resultados confirman la ausencia de efecto de la α -RgIA sobre los canales Ca_v con independencia de que puedan estar regulados por receptores GABA_B , como es el caso de los que se expresan en las neuronas DRG.

Los resultados farmacológicos obtenidos en neuronas DRG de la rata aparecen tabulados en el ANEXO II.

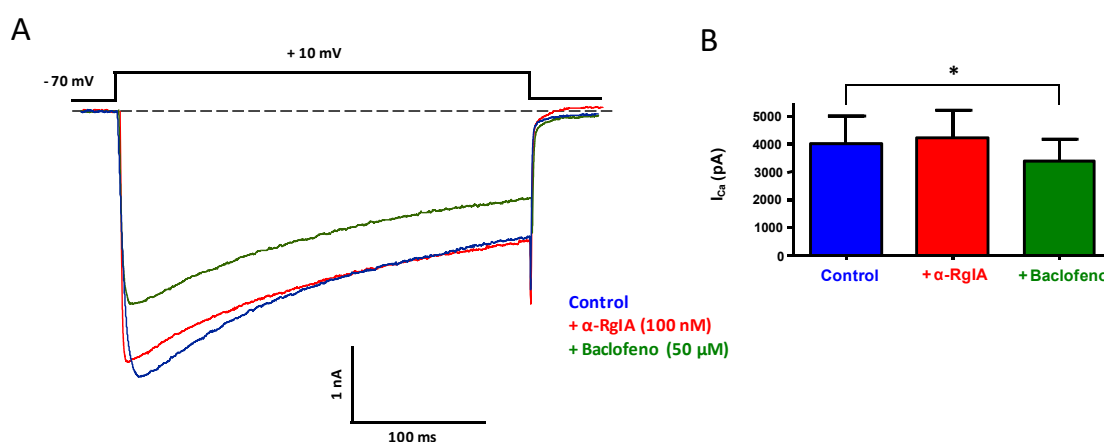


Figura 4.14. Efecto de la α -RgIA y del baclofeno sobre los canales Ca_v de las neuronas DRG de rata. **A.** Registros representativos del efecto de la α -RgIA (100 nM) y del baclofeno (50 μM) sobre las corrientes de Ca^{2+} activadas por la despolarización de la membrana (+10 mV, 300 ms) de las neuronas DRG. La solución intracelular contiene Cs^+ como principal catión y en la extracelular el Na^+ ha sido sustituido por TEA. $V_h = -70$ mV. **B.** Diagrama de barras del efecto de la α -RgIA (100 nM) y del baclofeno (50 μM) sobre las corrientes de Ca^{2+} dependientes de voltaje ($n = 5$). La amplitud de las corrientes de Ca^{2+} fue valorada al final del pulso despolarizante, inmediatamente antes de retornar al V_h . *, $P < 0,05$ con respecto al control.

4.2. EFECTO DEL FRÍO SOBRE EL PESO CORPORAL, EL TAMAÑO Y EL CONTENIDO DE CATECOLAMINAS DE LA GLÁNDULA ADRENAL DE LA RATA

Nuestro siguiente objetivo, previo al estudio de la expresión relativa de los distintos tipos de nAChRs en las células cromafines de la rata, fue la adopción de un modelo de estrés crónico que nos permitiera evaluar la plasticidad de los nAChRs.

Hace algunos años el grupo de la Dra. Nathalie Guerineau (Colomer y col., 2008a) empleó un paradigma experimental de estrés por frío (4 °C durante 5 días) para investigar el remodelado eléctrico de las células cromafines de la médula adrenal de ratas de la cepa Wistar. Sus principales hallazgos fueron el aumento de la frecuencia de corrientes sinápticas espontáneas (sEPSCs) y de la descarga espontánea de potenciales de acción así como del acoplamiento intercelular mediado por

uniones estrechas (*gap-junctions*). Estos cambios en la actividad y propiedades eléctricas de las células cromafines condujeron a un incremento de los niveles plasmáticos de CAs (A y NA) acompañado del descenso del contenido de las mismas en la glándula adrenal. En una colaboración con nuestro grupo (Colomer y col., 2010), pudo también evidenciarse un incremento de la expresión de nAChRs $\alpha 9^*$ que mediaban corrientes nicotínicas sensibles a α -RgIA. Estos resultados constituyen el principal antecedente de este trabajo, y nos llevaron a tratar de reproducir dicho modelo de estrés por frío en las ratas de la cepa SD de nuestro laboratorio.

Al objeto de valorar el impacto del paradigma de estrés por frío sobre el balance metabólico, decidimos valorar el peso de los animales. El peso de éstos fue de $225 \pm 4,3$ g y de $216 \pm 3,6$ g, antes y después, respectivamente, de la exposición al frío ($P < 0,001$; $n = 31$). Ello supone un descenso del $4 \pm 0,6\%$ en el peso de los animales estresados, lo que contrasta con el aumento del $16 \pm 1\%$ observado en ratas control, no sometidas a ese paradigma de estrés (desde $217 \pm 4,2$ g hasta $251 \pm 3,7$ g; $P < 0,0001$; $n = 47$).

Así mismo, se determinó el peso de las glándulas adrenales. Los valores obtenidos en animales control ($n = 21$ pares de glándulas) fueron de $21,2 \pm 0,7$ mg y $22,1 \pm 0,8$ mg, respectivamente para las glándulas adrenales derecha e izquierda, mientras que las glándulas de los animales sometidos al paradigma de estrés por frío ($n = 22$ pares de glándulas) alcanzaron pesos de $27,7 \pm 1,1$ mg (glándula derecha) y $26,7 \pm 1$ mg (glándula izquierda). Estos resultados indican un aumento significativo ($P < 0,001$) del peso de las glándulas adrenales en los animales sometidos a estrés por frío sin que se observen diferencias significativas entre las glándulas procedentes del lado derecho y las del lado izquierdo en ambos tipo de animales (**Figura 4.15A**).

Finalmente, se analizó el contenido de CAs de las glándulas adrenales procedentes tanto de animales control como de los sometidos a estrés por frío. Las determinaciones arrojaron valores de $7,98 \pm 0,62$ μ g y $1,16 \pm 0,08$ μ g, respectivamente para la A y la NA de las glándulas de las ratas sometidos a estrés por frío ($n = 10$), y de $10,39 \pm 1,43$ μ g y $1,84 \pm 0,29$ μ g para la A y la NA de las glándulas de los animales control ($n = 12$) (**Figura 4.15B**). Estos resultados muestran una disminución del $21 \pm 6\%$ ($P = 0,163$) del contenido de A y del $35 \pm 9\%$ ($P = 0,046$) del contenido en NA en las ratas sometidas al paradigma de estrés por frío.

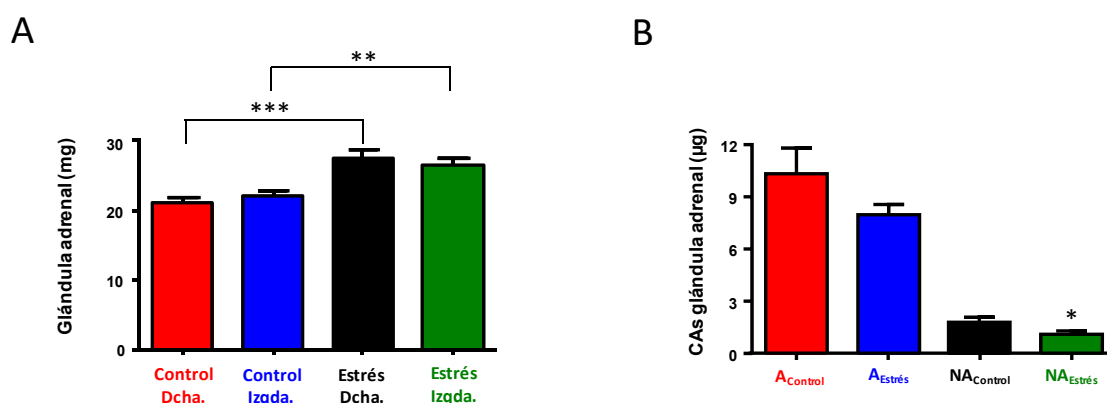


Figura. 4.15. Efecto del estrés por frío (4 °C, 5 días) sobre el peso y el contenido en CAs de las glándulas adrenales de la rata. **A.** Diagrama de barras representativo del peso de las glándulas adrenales de animales control (Control; n = 21 pares de glándulas) y de los sometidos a un protocolo de estrés por frío (Estrés; n = 22). El peso de las glándulas derecha (Dcha.) e izquierda (Izqda.) se valoró por separado al objeto de determinar las posibles diferencias entre ellas. **B.** Diagrama de barras representativo del contenido de CAs (A y NA) de las glándulas adrenales de animales control (Control; n = 12 glándulas) y sometidos a estrés por frío (Estrés; n = 10 glándulas). *, P < 0,05; **, P < 0,01; ***, P < 0,001 con respecto al Control correspondiente.

4.3 CARACTERIZACIÓN FARMACOLÓGICA DE LOS nAChRs DE LAS CÉLULAS CROMAFINES DE LA MÉDULA ADRENAL DE LA RATA: PLASTICIDAD INDUCIDA POR ESTRÉS

4.3.1. Efecto del estrés por frío sobre los nAChRs de las células cromafines aisladas de la rata

Como ya se ha indicado, el objetivo fundamental de este trabajo ha sido la caracterización farmacológica de los nAChRs de la membrana de las células cromafines de la rata y el análisis de los cambios que en la expresión de los mismos pudieran producirse en situaciones de estrés crónico. Una vez establecida la idoneidad de algunas de las herramientas farmacológicas necesarias para llevar a cabo dicha caracterización y apuntado la existencia de nuevos tipos de nAChRs heteroméricos formados por la combinación de la subunidad $\alpha 7$ con la $\alpha 9$ y/o $\alpha 10$, correspondía tratar de completar el catálogo de los nAChRs expresados por las células cromafines antes de acometer la tarea principal de establecer la contribución relativa de las distintas variedades de nAChRs a las corrientes nicotínicas de las células cromafines de la rata.

El tipo de nAChR más característico del SNC y, además, el responsable de la adicción a la nicotina es el formado por las subunidades $\alpha 4$ y $\beta 2$. Al objeto de investigar la posible existencia de nAChRs $\alpha 4\beta 2$ funcionales en las células cromafines de la rata procedimos al empleo de una herramienta farmacológica, el RJR 2403, que actúa como agonista selectivo de dichos receptores (Bencherif y col., 1996; Lippiello y col., 1996). La administración de RJR 2403 (100 μ M, 5 s) no indujo la aparición de corriente alguna en células en las que previamente se había comprobado la respuesta (525 ± 107 pA; n = 5) a la ACh (100 μ M, 1 s) (**Figura 4.16**). Estos resultados descartarían

la expresión de nAChRs $\alpha 4\beta 2$ funcionales en nuestros cultivos de células cromafines de la médula adrenal de la rata.

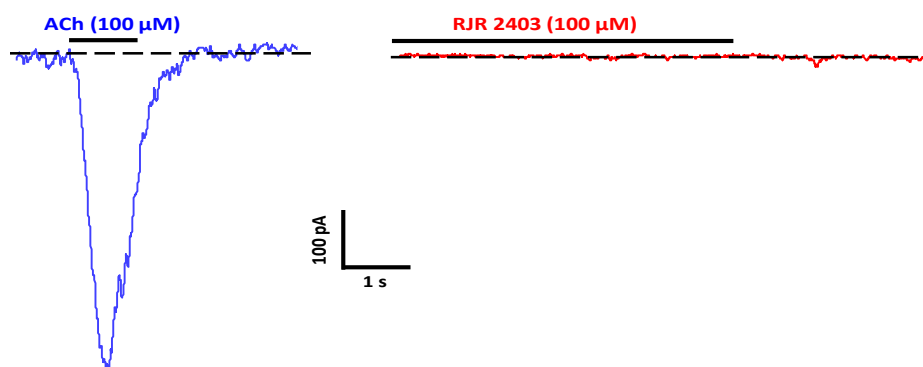


Figura. 4.16. Corrientes iónicas inducidas por la administración consecutiva de ACh (100 μ M, 1 s; panel izquierdo) y RJR 2403 (100 μ M, 5 s; panel derecho) en una célula cromafín aislada de la médula adrenal de la rata. $V_h = -70$ mV. Los registros son representativos de los obtenidos en 5 células.

La caracterización farmacológica de los nAChRs de las células cromafines de la rata y el estudio de la plasticidad de los mismos durante el estrés crónico se ha basado en el análisis de los efectos de diversos fármacos antagonistas selectivos de los distintos nAChRs sobre las respuestas de corriente inducidas por el agonista fisiológico, la ACh (100 μ M) y, ocasionalmente, sobre las inducidas por Nic (30 μ M) y Oxo-M (300 μ M), dos fármacos con efectos característicos sobre los nAChRs $\alpha 9^*$, dado que la Nic se comporta como antagonista de los mismos, mientras que la Oxo-M presentaría una cierta selectividad para activarlos, si bien con escasa eficacia. Adicionalmente, la respuesta a los fármacos agonistas permite detectar cambios en la expresión absoluta de los nAChRs durante el estrés crónico.

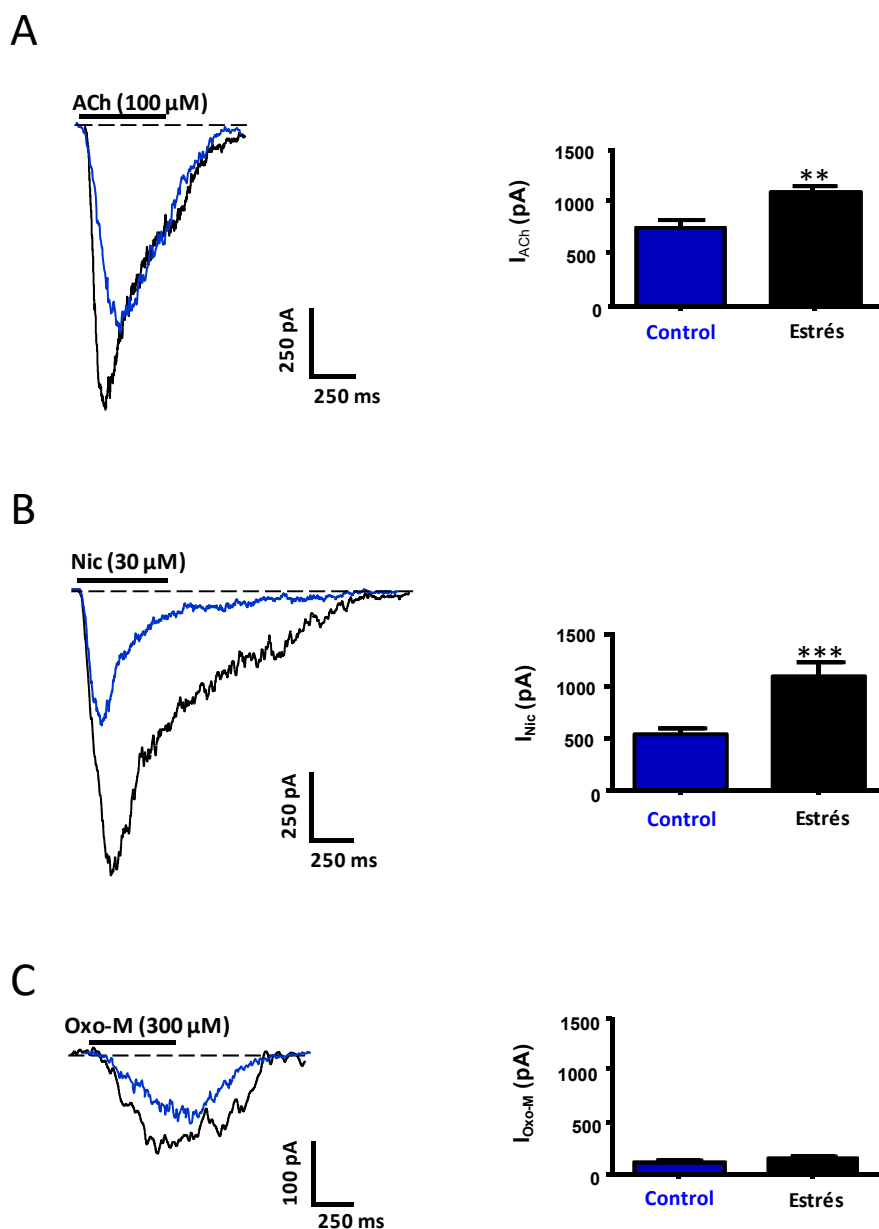


Figura 4.17. Corrientes iónicas inducidas por la administración de ACh, Nic y Oxo-M en células cromafines de rata procedentes de animales sometidos a un protocolo de estrés por frío (Estrés; trazos azules) y sus controles (Control; trazos negros). **A.** Registros representativos y diagrama de barras de las corrientes inducidas por la administración de ACh (100 μ M, 500 ms) en células cromafines de animales control ($n = 81$) y estresados ($n = 43$). **B.** Registros representativos y diagrama de barras de las corrientes inducidas por la administración de Nic (30 μ M, 500 ms) en células cromafines de animales control ($n = 49$) y estresados ($n = 20$). **C.** Registros representativos y diagrama de barras de las corrientes inducidas por la administración de Oxo-M (300 μ M, 500 ms) en células cromafines de animales control ($n = 99$) y estresados ($n = 29$). $V_h = -70$ mV. **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$ con respecto al Control.

La administración de ACh, Nic u Oxo-M a células cromafines aisladas procedentes de animales control generó corrientes iónicas con amplitudes máximas de 745 ± 59 pA ($n = 81$), 540 ± 44 pA ($n = 49$) y 109 ± 11 pA ($n = 99$), respectivamente. Por su parte, los valores promedio de las corrientes inducidas por ACh, Nic y Oxo-M en células cromafines de animales estresados fueron de

1.071 \pm 81 pA (n = 43), 1.087 \pm 127 pA (n = 20) y 146 \pm 16 pA (n = 29), respectivamente (**Figura 4.17**). Estos resultados ponen de manifiesto un aumento de la magnitud de la respuesta al agonista endógeno en las células cromafines de animales sometidos al paradigma de estrés por frío, lo que en ausencia de cambios en la capacidad de la membrana celular (5,8 \pm 0,4 pF y 5,9 \pm 0,6 pF, en condiciones control (n = 19) y de estrés (n = 16), respectivamente; P = 0,89) indicaría una mayor expresión de nAChRs en la membrana de estas células. Es de señalar también el aumento de las respuestas a Nic sin que para el conjunto de las células analizadas en este trabajo se afectara la magnitud de las inducidas por Oxo-M. En concordancia con estos resultados están los obtenidos en cortes de la glándula adrenal de rata, en los que la administración de ACh indujo corrientes iónicas cuya magnitud fue de 453 \pm 29 pA (n = 58; 8 ratas) y de 652 \pm 55 pA (n = 36; 14 ratas) en las células cromafines de animales control y estresados, respectivamente (**Figura 4.18**). La capacidad media de una muestra de células cromafines fue de 10,4 \pm 3 pF (n = 36; 16 ratas) en cortes de glándulas procedentes de animales control, mientras que en las procedentes de animales estresados la capacidad media fue 11,7 \pm 0,3 pF (n = 55; 14 ratas; P < 0,0001).

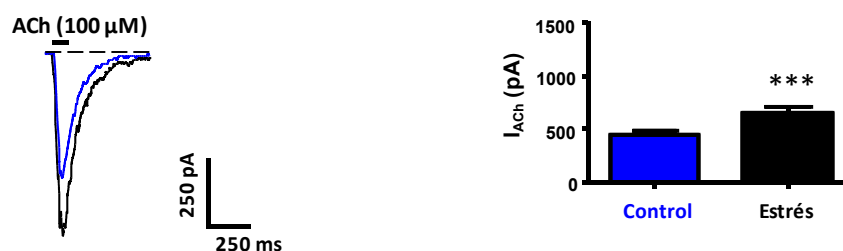


Figura 4.18. Corrientes iónicas inducidas por la administración de ACh en células cromafines en cortes de la glándula adrenal de ratas sometidas a un protocolo de estrés por frío (Estrés; trazo azul) y sus controles (Control; trazo negro). Registros representativos y diagrama de barras de las corrientes inducidas por la administración de ACh (100 μ M, 100 ms) en células cromafines de animales control (n = 58) y estresados (n = 36). V_h = -70 mV. ***, P < 0,005 con respecto al Control.

A continuación y al objeto de identificar farmacológicamente los tipos de nAChRs expresados por las células cromafines de la glándula adrenal, tanto de animales control como sometidos a estrés por frío, procedimos al empleo de diversos fármacos antagonistas selectivos de diferentes nAChRs. Entre los pertenecientes a la familia de las α -conotoxinas, evaluamos en primer lugar el efecto de la α -MII, un antagonista selectivo de los nAChRs $\alpha 3\beta 2^*$ y $\alpha 6^*$. La superfusión de las células cromafines procedentes de animales control con α -MII (200 nM) produjo una inhibición de las corrientes inducidas por ACh del 30 \pm 4% (P < 0,0001), con la consiguiente reducción de la amplitud máxima de las mismas desde un valor de 551 \pm 54 pA en condiciones control hasta 388 \pm 46 pA en presencia de la toxina (n = 20). Porcentajes de inhibición similares fueron obtenidos cuando las corrientes fueron inducidas por Nic (22 \pm 3%, P < 0,0001; reducción de la amplitud máxima de

la corriente desde 426 ± 42 pA hasta 327 ± 33 pA; $n = 7$) u Oxo-M ($21 \pm 8\%$, $P < 0,0001$; reducción de la corriente desde 82 ± 13 pA hasta 62 ± 9 pA; $n = 8$). En las células cromafines provenientes de ratas sometidas al modelo de estrés por frío se constató un incremento significativo de la magnitud de las corrientes inducidas por ACh (amplitud máxima de la corriente de 1.159 ± 220 pA; $n = 10$) y Oxo-M (amplitud máxima de la corriente de 187 ± 45 pA; $n = 6$). Sin embargo, los porcentajes de inhibición de las corrientes producidos por la administración de α -MII fueron similares ($29 \pm 5\%$, $P < 0,0001$ y $17 \pm 6\%$, $P < 0,0001$, respectivamente para ACh y Oxo-M) a los observados en los animales control, lo que indicaría que si bien el número de nAChRs $\alpha 3\beta 2^*$ y $\alpha 6^*$ de las células cromafines podría incrementarse por el paradigma de estrés que empleamos, la expresión relativa de los mismos no se vería modificada (**Figura 4.19**).

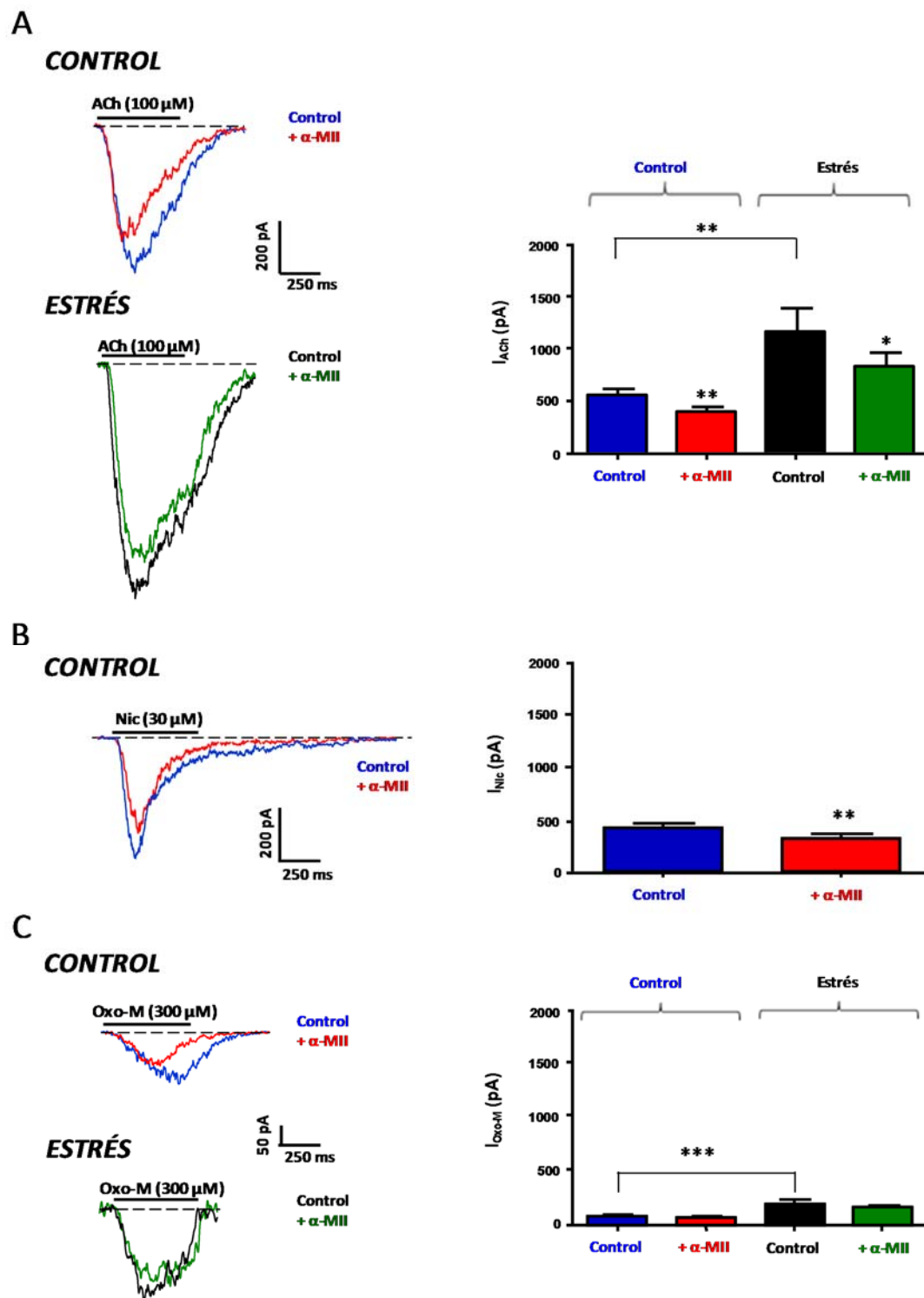


Figura 4.19. Efecto de la α -MII sobre las corrientes inducidas por ACh, Nic y Oxo-M en células cromafines de rata procedentes de animales sometidos a un protocolo de estrés por frío (Estrés) y sus controles (Control). **A.** Registros representativos y diagrama de barras del efecto bloqueante de la α -MII (200 nM) sobre las corrientes inducidas por ACh (100 μ M, 500 ms) en células cromafines de animales control (n = 20) y estresados (n = 10). **B.** Registros representativos y diagrama de barras del efecto bloqueante de la α -MII (200 nM) sobre las corrientes inducidas por Nic (30 μ M, 500 ms) en células cromafines de animales control (n = 7). **C.** Registros representativos y diagrama de barras del efecto bloqueante de la α -MII (200 nM) sobre las corrientes inducidas por Oxo-M (300 μ M, 500 ms) en células cromafines de animales control (n = 8) y estresados (n = 6). $V_h = -70$ mV. *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$ con respecto a la condición correspondiente libre de fármaco o a los animales control.

El segundo de los antagonistas empleados fue la α -AuIB, un bloqueante selectivo de los nAChRs $\alpha 3\beta 4^*$. La α -AuIB (3 μ M), administrada a células procedentes de animales control, redujo un $66 \pm 3\%$ ($P < 0,0001$) la amplitud máxima de las corrientes inducidas por ACh (desde 311 ± 33 pA hasta 91 ± 9 pA; $n = 19$), mientras que el porcentaje de inhibición en este mismo tipo de células de las corrientes inducidas por Nic fue del $66 \pm 4\%$ ($P < 0,0001$; disminución de la corriente desde 326 ± 47 pA hasta 99 ± 12 pA; $n = 12$). Por otra parte, en células procedentes de animales estresados se detectó un incremento de la magnitud de las corrientes inducidas por ACh, que no se vio acompañado por un aumento de la fracción sensible a α -AuIB, que fue del $62 \pm 12\%$ ($P = 0,0013$; magnitudes máximas de la corriente de 837 ± 50 pA y de 311 ± 21 pA, antes y después respectivamente del tratamiento con α -AuIB; $n = 4$) (**Figura 4.20**). A la vista de los resultados obtenidos mediante el uso de α -AuIB cabría concluir que nuestro paradigma de estrés por frío podría dar lugar a un aumento del número de nAChRs $\alpha 3\beta 4^*$ pero no incrementaría la expresión relativa de los mismos en las células cromafines de la médula adrenal de la rata.

La siguiente toxina antagonista empleada fue la α -ArIB, que como ya se ha mencionado bloquea selectivamente los nAChRs $\alpha 7^*$. El tratamiento con α -ArIB (50 nM) redujo un $23 \pm 4\%$ ($P < 0,0001$) la amplitud máxima de las corrientes generadas por ACh (517 ± 130 pA y 421 ± 115 pA, en presencia y ausencia de α -ArIB, respectivamente; $n = 9$). Este porcentaje fue inferior al obtenido ($32 \pm 5\%$, $P < 0,0001$) cuando el agonista empleado fue la Nic (la amplitud máxima de las corrientes disminuyó desde 462 ± 96 pA hasta 318 ± 70 pA tras el tratamiento con ArIB; $n = 8$) y similar al observado ($17 \pm 2\%$, $P = 0,0008$) cuando se utilizó la Oxo-M (las corrientes disminuyeron desde un valor control de 125 ± 8 pA hasta 105 ± 14 pA en presencia de ArIB; $n = 5$). En las células cromafines procedentes de ratas estresadas se observó un aumento de la magnitud de las corrientes nicotínicas y de los porcentajes de bloqueo producido por la α -ArIB (50 nM): $35 \pm 6\%$ ($P < 0,0001$) para la ACh (la magnitud de la corriente máxima disminuyó desde 1.055 ± 165 pA hasta 729 ± 139 pA; $n = 13$), $51 \pm 3\%$ ($P < 0,0001$) para la Nic (la magnitud de la corriente disminuyó desde 1.125 ± 152 pA hasta 566 ± 88 pA tras el tratamiento con α -ArIB; $n = 10$) y $23 \pm 7\%$ ($P = 0,0004$) para la Oxo-M (la corriente disminuyó desde un valor control de 105 ± 19 pA hasta 85 ± 51 pA tras el tratamiento con α -ArIB; $n = 5$) (**Figura 4.21**). Estos resultados sugieren que nuestro paradigma experimental induce un aumento tanto de la expresión absoluta como de la relativa de nAChRs $\alpha 7^*$ funcionales en las células cromafines de la rata.

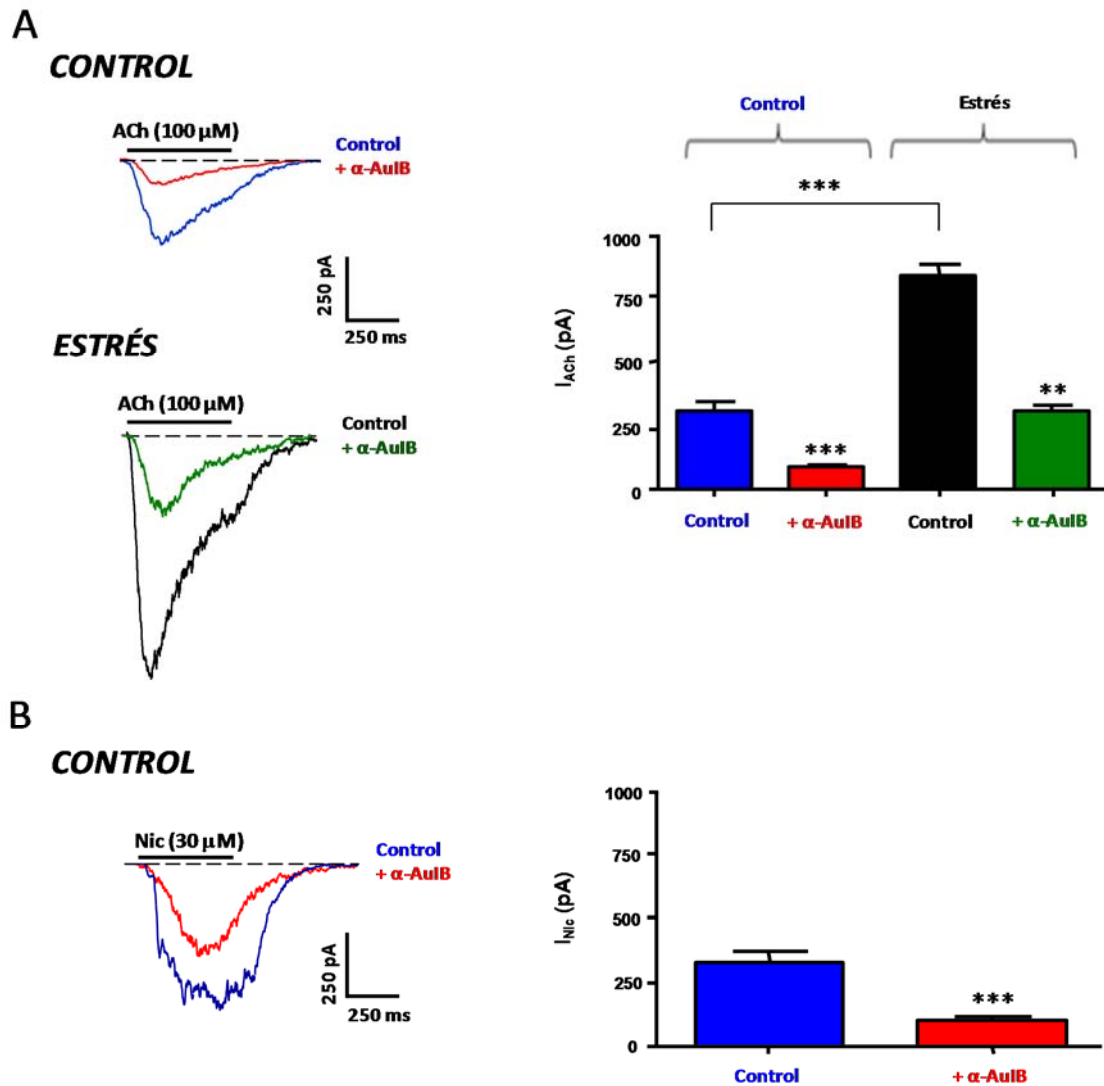


Figura 4.20. Efecto de la α -AulB sobre las corrientes inducidas por ACh y Nic en células cromafines de rata procedentes de animales sometidos a un protocolo de estrés por frío (Estrés) y sus controles (Control). **A.** Registros representativos y diagrama de barras del efecto bloqueante de la α -AulB (3 μ M) sobre las corrientes inducidas por ACh (100 μ M, 500 ms) en células cromafines de animales control (n = 19) y estresados (n = 4). **B.** Registros representativos y diagrama de barras del efecto bloqueante de la α -AulB (3 μ M) sobre las corrientes inducidas por Nic (30 μ M, 500 ms) en células cromafines de animales control (n = 12). V_h = -70 mV. **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$ con respecto a la condición correspondiente libre de fármaco o a los animales control.

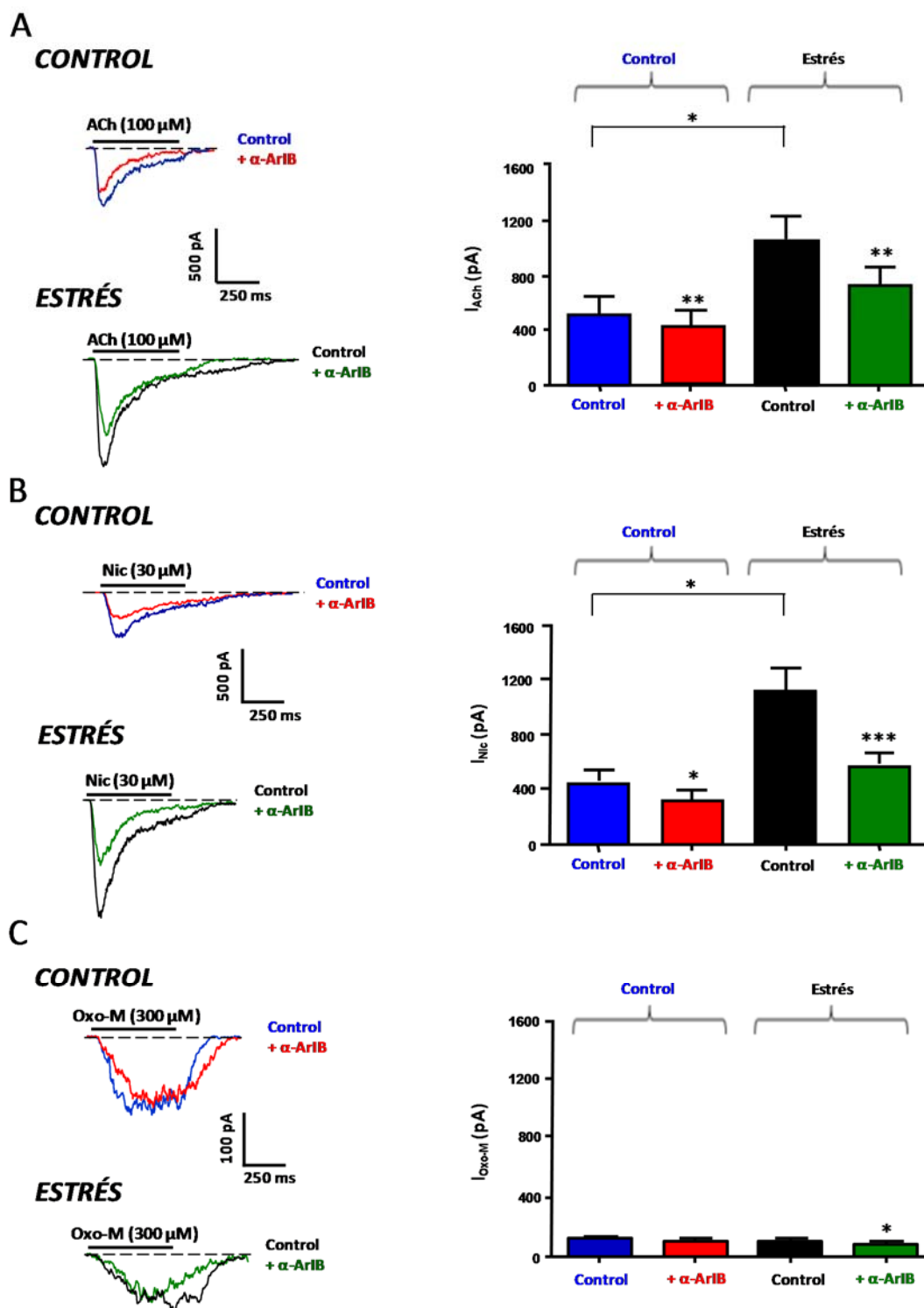


Figura 4.21. Efecto de la α -AriB sobre las corrientes inducidas por ACh, Nic y Oxo-M en células cromafines de rata procedentes de animales sometidos a un protocolo de estrés por frío (Estrés) y sus controles (Control) **A.** Registros representativos y diagrama de barras del efecto bloqueante de la α -AriB (50 nM) sobre las corrientes inducidas por ACh (100 μ M, 500 ms) en células cromafines de animales control (n = 9) y estresados (n = 13). **B.** Registros representativos y diagrama de barras del efecto bloqueante de la α -AriB (50 nM) sobre las corrientes inducidas por Nic (30 μ M, 500 ms) en células cromafines de animales control (n = 8) y estresados (n = 10). **C.** Registros representativos y diagrama de barras del efecto bloqueante de la α -AriB (50 nM) sobre las corrientes inducidas por Oxo-M (300 μ M, 500 ms) en células cromafines de animales control (n = 5) y estresados (n = 5). $V_h = -70$ mV. *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$ con respecto a la condición correspondiente libre de fármaco o a los animales control.

La última toxina utilizada perteneciente a la familia de las α -conotoxinas fue la α -RgIA, que como ya hemos mostrado bloquearía de forma selectiva a los nAChRs $\alpha 9^*$. En las células cromafines procedentes de animales control, la α -RgIA (100 nM) inhibió un $28 \pm 4\%$ ($P < 0,0001$) la corriente inducida por ACh (815 ± 135 pA y 583 ± 97 pA, antes y después respectivamente del tratamiento con α -RgIA; $n = 22$). En el caso de las corrientes inducidas por Nic, el porcentaje de inhibición fue del $25 \pm 2\%$ ($P < 0,0001$; disminución de la amplitud máxima de la corriente desde 745 ± 100 pA hasta 565 ± 86 pA en presencia de la toxina; $n = 16$), mientras que fue del $48 \pm 6\%$ ($P < 0,0001$) para las corrientes inducidas por Oxo-M (81 ± 8 pA y 47 ± 7 pA, antes y después respectivamente del tratamiento con α -RgIA; $n = 48$). Por otra parte, en las células cromafines procedentes de animales estresados los porcentajes de inhibición fueron del $40 \pm 5\%$ ($P < 0,0001$) para las corrientes inducidas por ACh (reducción de la corriente desde 684 ± 137 pA hasta 427 ± 123 pA; $n = 8$) y del $40 \pm 3\%$ ($P = 0,0001$) para las corrientes inducidas por Nic (reducción de la corriente desde 866 ± 125 pA hasta 540 ± 123 pA; $n = 8$) (**Figura 4.22**). En conjunto, los resultados obtenidos mediante el uso de α -RgIA sugieren que nuestro paradigma de estrés por frío induce un incremento de los nAChRs $\alpha 9^*$ en las células cromafines de ratas SD, en concordancia con lo descrito previamente para las ratas Wistar (Colomer y col., 2010).

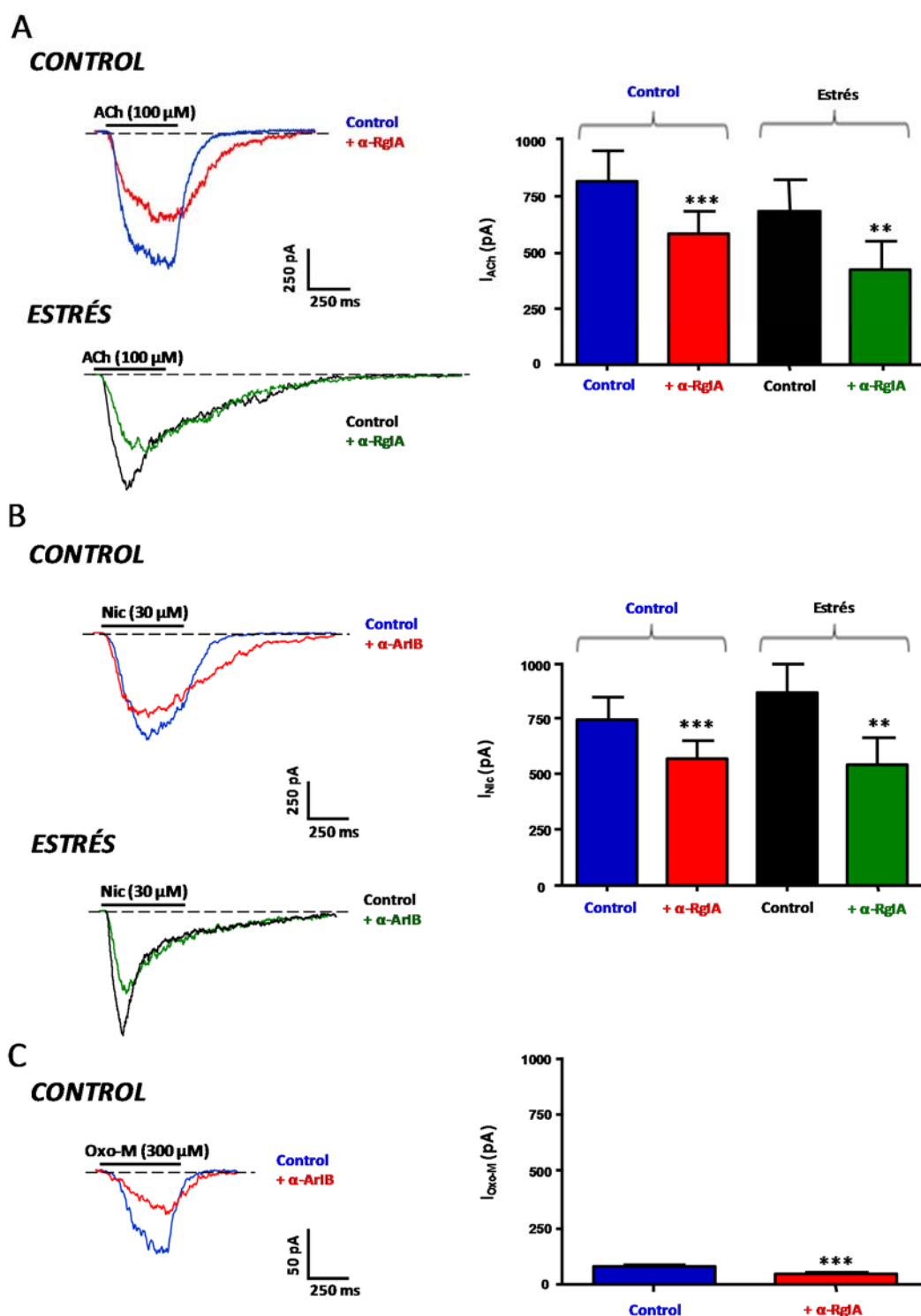


Figura 4.22. Efecto de la α -RgIA sobre las corrientes inducidas por ACh, Nic y Oxo-M en células cromafines de rata procedentes de animales sometidos a un paradigma de estrés por frío (Estrés) y sus controles (Control). **A.** Registros representativos y diagrama de barras del efecto bloqueante de la α -RgIA (100 nM) sobre las corrientes inducidas por ACh (100 μ M, 500 ms) en células cromafines de animales control (n = 22) y estresados (n = 8). **B.** Registros representativos y diagrama de barras del efecto bloqueante de la α -RgIA (100 nM) sobre las corrientes inducidas por Nic (30 μ M, 500 ms) en células cromafines de animales control (n = 16) y estresados (n = 8). **C.** Registros representativos y diagrama de barras del efecto bloqueante de la α -RgIA (100 nM) sobre las corrientes inducidas por Oxo-M (300 μ M, 500 ms) en células cromafines de animales control (n = 48). V_h = - 70 mV. *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$ con respecto a la condición correspondiente en ausencia de fármaco.

A fin de completar la caracterización farmacológica de los nAChRs de las células cromafines de la rata y de sus posibles modificaciones en respuesta a un protocolo de estrés crónico por frío, recurrimos al estudio de los efectos de la MLA, un antagonista de los nAChRs $\alpha 6^*$, $\alpha 7^*$ y $\alpha 9^*$ a concentraciones inferiores a 100 nM. En células cromafines procedentes de animales control, la administración de MLA (20 nM) redujo en un $34 \pm 2\%$ ($P < 0,0001$) la amplitud máxima de las corrientes inducidas por ACh (324 ± 38 pA y 212 ± 23 pA, antes y después, respectivamente, del tratamiento con MLA; $n = 6$), un $28 \pm 4\%$ ($P < 0,0001$) las corrientes inducidas por Nic (reducción de la amplitud de la corriente desde 547 ± 97 pA hasta 401 ± 83 pA después del tratamiento con MLA; $n = 7$) y un $45 \pm 7\%$ ($P < 0,0001$) las corrientes inducidas por Oxo-M (disminución de la amplitud de la corriente desde 216 ± 83 pA hasta 123 ± 57 pA tras la incubación con MLA; $n = 11$). Por otra parte, en las células cromafines de la médula adrenal de ratas estresadas los porcentajes de inhibición de las corrientes inducidas por ACh, Nic y Oxo-M fueron del $54 \pm 5\%$ ($P < 0,0001$; $n = 12$), $53 \pm 9\%$ ($P < 0,0001$; $n = 10$) y $51 \pm 5\%$ ($P < 0,0001$; $n = 10$), valores mayores que los obtenidos en células de animales control (**Figura 4.23**). Estos incrementos reflejarían el aumento de la expresión relativa y absoluta (en las células procedentes de animales estresados se observó un aumento de la magnitud de las corrientes inducidas por ACh y Nic, que, respectivamente, alcanzaron amplitudes máximas de 732 ± 155 pA y 856 ± 224 pA) de los nAChRs $\alpha 6^*$, $\alpha 7^*$ y $\alpha 9^*$ en las células cromafines de los animales sometidos al paradigma de estrés por frío.

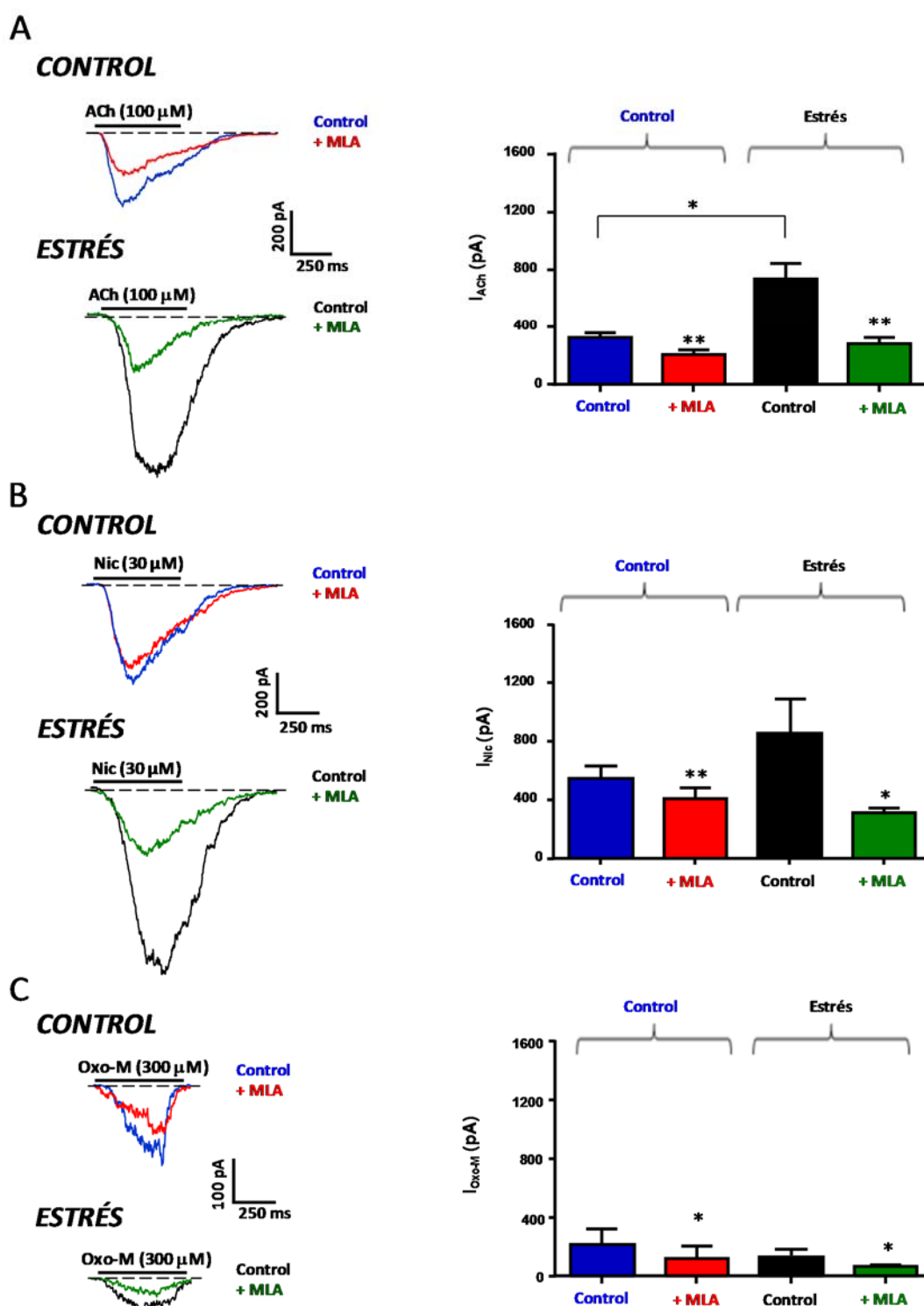


Figura 4.23. Efecto de la MLA sobre las corrientes inducidas por ACh, Nic y Oxo-M en células cromafines de rata procedentes de animales sometidos a un protocolo de estrés por frío (Estrés) y sus controles (Control). **A.** Registros representativos y diagrama de barras del efecto bloqueante de la MLA (20 nM) sobre las corrientes inducidas por ACh (100 μ M, 500 ms) en células cromafines de animales control ($n = 6$) y estresados ($n = 12$). **B.** Registros representativos y diagrama de barras del efecto bloqueante de la MLA (20 nM) sobre las corrientes inducidas por Nic (30 μ M, 500 ms) en células cromafines de animales control ($n = 7$) y estresados ($n = 10$). **C.** Registros representativos y diagrama de barras del efecto bloqueante de la MLA (20 nM) sobre las corrientes inducidas por Oxo-M (300 μ M, 500 ms) en células cromafines de animales control ($n = 11$) y estresados ($n = 10$). $V_h = -70$ mV. *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$ con respecto a la condición correspondiente libre de fármaco o a los animales control.

4.3.2. Caracterización farmacológica de nuevos nAChRs heteroméricos en las células cromafines aisladas de la rata

Una vez realizada la caracterización farmacológica básica de las corrientes nicotínicas de las células cromafines de la médula adrenal de rata mediante el empleo en cada experimento de un solo antagonista selectivo de alguna o algunas de las subunidades formadoras de nAChRs, nos planteamos investigar la existencia de nAChRs heteroméricos constituidos por las subunidades $\alpha 7$, $\alpha 9$ y/o $\alpha 10$, las subunidades $\alpha 3$ y $\alpha 6$ o las $\beta 2$ y $\beta 4$. Para ello, recurrimos a la administración consecutiva y con carácter acumulativo de dos toxinas selectivas para las subunidades de interés. La disminución (oclusión parcial) del efecto de la toxina administrada en segundo lugar en relación al observado cuando se administra en primer lugar (“orden inverso” de administración) o sola sugeriría la existencia de nAChRs funcionales formados por subunidades afines a las dos toxinas. Así mismo, la desaparición del efecto de la segunda toxina (oclusión completa) implicaría que en la preparación objeto de estudio la subunidad afín a la misma se expresaría siempre junto a la subunidad afín a la toxina administrada en primer lugar. Inicialmente, evaluamos las respuestas a la administración de α -ArIB y α -RgIA. En células cromafines procedentes de animales control, la administración de α -ArIB (50 nM) produjo una disminución del $28 \pm 5\%$ ($P = 0,0003$) de las corrientes inducidas por ACh (disminución de la amplitud máxima desde 211 ± 58 pA hasta 155 ± 51 pA; $n = 5$). La administración subsiguiente de α -RgIA (100 nM) redujo la amplitud máxima de las corrientes hasta valores de 135 ± 45 pA (inhibición del $36 \pm 5\%$ de la corriente inicial en ausencia de ambas toxinas; $P = 0,0004$). Ello implica un bloqueo adicional con respecto al producido por α -ArIB de solo un $8 \pm 1\%$ (**Figura 4.24A**). Estos porcentajes de bloqueo difirieron de los obtenidos al invertir la secuencia de administración de las toxinas. La administración en primer lugar de α -RgIA produjo una disminución del $21 \pm 5\%$ ($P < 0,0001$) de las corrientes inducidas por ACh (la amplitud máxima de la corriente se redujo desde 430 ± 96 pA hasta 327 ± 99 pA en presencia de α -RgIA; $n = 8$). La administración subsiguiente de α -ArIB (50 nM) redujo la amplitud máxima de las corrientes hasta valores de 278 ± 55 pA (inhibición del $35 \pm 4\%$ de la corriente inicial en ausencia de ambas toxinas; $P = 0,0003$) (**Figura 4.24B**). Estos valores implican un bloqueo adicional por la α -ArIB, respecto al obtenido con la α -RgIA, del $14 \pm 5\%$. En conjunto, nuestros resultados demuestran la oclusión recíproca (solapamiento) de los efectos de α -RgIA y α -ArIB, lo que sugiere de acuerdo al análisis de la interacción de antagonistas nicotínicos (véase el epígrafe 3.2.10 de la sección de MATERIALES Y MÉTODOS) que el 50% de las subunidades $\alpha 7$ y el 62% de las subunidades $\alpha 9$ y $\alpha 10$ de las células cromafines de la rata se asociarían entre sí para constituir nAChRs heteroméricos funcionales.

En las células procedentes de animales estresados el tratamiento con α -ArIB (50 nM) redujo en un $42 \pm 5\%$ ($P = 0,0055$) la amplitud máxima de las corrientes inducidas por ACh (265 ± 61 pA y 153 ± 23 pA, antes y después, respectivamente, de la incubación con α -ArIB; $n = 4$). La subsiguiente incubación conjunta de α -RgIA (100 nM) y α -ArIB (50 nM) inhibió las corrientes

iniciales (en ausencia de ambas toxinas) inducidas por ACh en un $54 \pm 5\%$ ($P = 0,0081$) (**Figura 4.24A**). Ello implica un aumento del porcentaje de bloqueo de solo el $12 \pm 3\%$ en relación al observado en presencia únicamente de α -ArIB. La inversión del orden de administración de las toxinas, con la incubación primero con α -RgIA (100 nM), se asoció a la disminución de un $40 \pm 6\%$ ($P = 0,0062$) de la amplitud de las corrientes inducidas por ACh (amplitud de 419 ± 144 pA y de 251 ± 38 pA antes y después, respectivamente, de la incubación con α -RgIA; $n = 4$). La posterior incubación con ambas toxinas, α -RgIA (100 nM) y α -ArIB (50 nM), produjo un descenso adicional de las corrientes inducidas por ACh, que alcanzaron amplitudes máximas de 201 ± 44 pA, lo que supone un bloqueo del $52 \pm 8\%$ ($P = 0,0054$) de las corrientes nicotínicas iniciales (**Figura 4.24B**). Este porcentaje de bloqueo implica un aumento del $12 \pm 3\%$ respecto al obtenido tras la incubación con α -RgIA sola. Nuestros resultados confirman el aumento de la expresión relativa de las subunidades $\alpha 7$, $\alpha 9$ y/o $\alpha 10$ en las células cromafines de los animales estresados, al tiempo que apuntan a un ligero incremento de la fracción de las subunidades $\alpha 7$ (71%) y de las subunidades $\alpha 9$ y $\alpha 10$ (70%) que formarían nAChRs heteroméricos funcionales.

Aunque los resultados obtenidos mediante el empleo de α -MII y α -AuIB (**Figura 4.19 y 4.20**) son compatibles con la existencia de dos nAChRs heteroméricos, $\alpha 3\beta 2$ y $\alpha 3\beta 4$, independientes en las células cromafines de la rata, la falta de aditividad (oclusión) de los efectos de concentraciones submáximas (100 nM) de ambas toxinas observada por Di Angelantonio y col. (2003) en nuestra misma preparación, permitió a dichos autores sugerir la existencia de nAChRs complejos, del tipo $\alpha 3\beta 2\beta 4$. De forma similar, aunque en razón de la elevada expresión de nAChRs $\alpha 6^*$ en las células cromafines humanas, Pérez-Álvarez (Pérez-Álvarez y col., 2012) interpretaron la oclusión de los efectos de ambas toxinas (3 μ M α -AuIB y 100 nM α -MII) como debida a la existencia de una diana farmacológica común, el nAChR $\alpha 3\alpha 6\beta 4^*$. Así mismo, el hecho de que en nuestros experimentos, la suma de los porcentajes de inhibición de la corriente inducida por ACh producidos por α -AuIB, α -MII y MLA supere sobradamente el valor de 100 en las células procedentes de animales control apunta a la existencia de solapamientos en los efectos de dichos antagonistas, atribuibles no tanto a la falta de selectividad de los mismos como al hecho de unirse a subunidades formadoras de nAChRs heteroméricos complejos, constituidos por al menos dos subunidades α ($\alpha 3$ y $\alpha 6$) o dos β ($\beta 2$ y $\beta 4$) distintas. Es probable, además, que algunos de los nAChRs incluyan también la subunidad $\alpha 5$, que se expresa en las células cromafines de rata, si bien la investigación de este extremo trasciende las posibilidades de nuestro abordaje farmacológico.

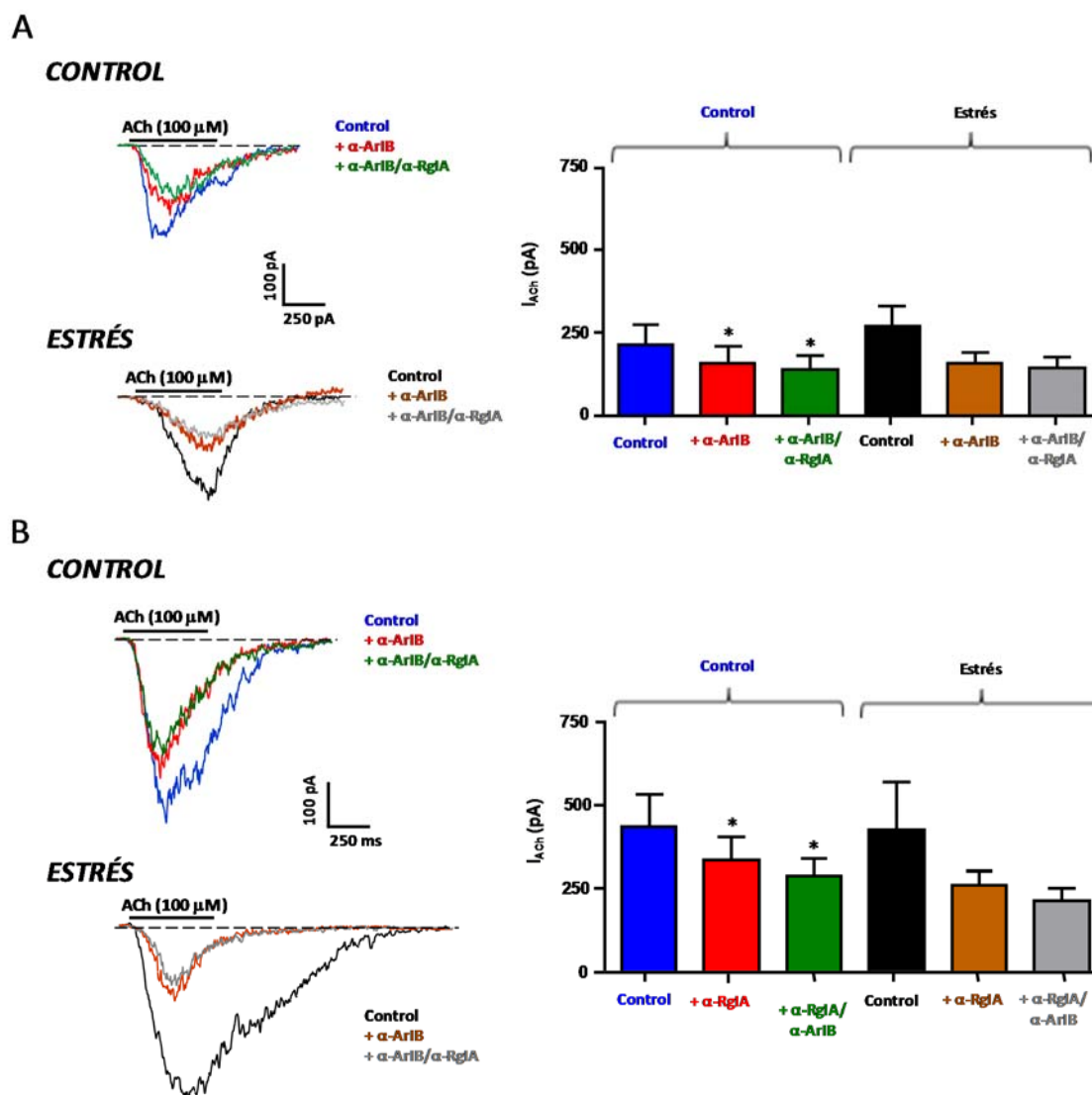


Figura 4.24. Oclusión de los efectos de la α -AriB y la α -RgIA sobre las corrientes inducidas por ACh en células cromafines de rata procedentes de animales sometidos a un protocolo de estrés por frío (Estrés) y sus controles (Control). **A.** Registros representativos y diagrama de barras del efecto bloqueante de la administración de α -AriB (50 nM; + α -AriB) y de la posterior administración de α -AriB y α -RgIA (100 nM) (+ α -AriB/ α -RgIA) sobre las corrientes inducidas por ACh (100 μ M, 500 ms) en células cromafines de animales control (n = 5) y estresados (n = 4). **B.** Registros representativos y diagrama de barras del efecto bloqueante de la administración de α -RgIA (100 nM; + α -RgIA) y de la posterior administración de α -RgIA y α -AriB (50 nM) (+ α -RgIA/+ α -AriB) sobre las corrientes inducidas por ACh (100 μ M, 500 ms) en células cromafines de animales control (n = 8) y estresados (n = 4). *, P < 0,05; **, P < 0,01; ***, P < 0,001 con respecto a la condición control correspondiente en ausencia de fármacos.

Dado que las células cromafines de la rata expresan el ARNm de la subunidad $\alpha 6$ (Solís-Garrido, 2006), nos planteamos evaluar en nuestra preparación el efecto combinado de tres fármacos antagonistas nicotínicos (α -AuiB, α -MII y MLA) capaces de interactuar con los nAChRs $\alpha 6^*$ (incluyendo los heteroméricos $\alpha 3\alpha 6^*$, $\alpha 6\beta 2^*$ y $\alpha 6\beta 4^*$) y los nAChRs $\alpha 3^*$ (incluyendo los nAChRs

$\alpha 3\beta 2$, $\alpha 3\beta 4$ y $\alpha 3\beta 2\beta 4$). La administración en primer lugar de MLA (20 nM) a células de animales control produjo una inhibición del $34 \pm 2\%$ ($P < 0,0001$) de la corriente inducida por ACh (reducción de la amplitud máxima de la corriente desde 324 ± 39 pA hasta 212 ± 23 pA; $n = 6$). La subsiguiente administración conjunta de MLA y α -MII (200 nM) redujo la corriente hasta valores de 144 ± 8 pA, lo que implica una inhibición del $55 \pm 4\%$ ($P = 0,0214$) de la corriente inicial. El porcentaje de inhibición atribuible a α -MII en estas condiciones experimentales ($21 \pm 5\%$), que resultaría del bloqueo de nAChRs $\alpha 3\beta 2^*$, es menor que el que se obtiene tras la administración de α -MII en solitario ($30 \pm 4\%$), lo que reflejaría la expresión de aproximadamente un 9% de nAChRs $\alpha 6^*$ funcionales por las células cromafines de rata. Finalmente, la adición de α -AuIB (3 μ M) a la combinación de MLA y α -MII condujo a una inhibición del $95 \pm 1\%$ ($P = 0,0242$) de la corriente nicotínica inicial (amplitud máxima residual de 16 ± 5 pA). El porcentaje de inhibición atribuible a α -AuIB fue del $40 \pm 3\%$ y reflejaría la actuación de la toxina exclusivamente sobre nAChRs $\alpha 3\beta 4$ (**Figura 4.25**). El empleo de la misma secuencia de administración de fármacos antagonistas en células procedentes de animales estresados permitió evidenciar un incremento significativo de la amplitud de las corrientes nicotínicas (amplitud máxima de 486 ± 53 pA; $n = 3$) respecto a la de sus correspondientes controles, así como un incremento del efecto inhibidor ($41 \pm 8\%$, $P = 0,0194$) de la MLA (reducción de la amplitud de la corriente hasta 294 ± 75 pA), compatible con el aumento de la expresión relativa de nAChRs $\alpha 7^*$, $\alpha 9^*$ y $\alpha 10^*$. Los porcentajes de inhibición de la corriente obtenidos tras la administración acumulativa de α -MII ($61 \pm 10\%$, $P = 0,0632$; reducción de la corriente hasta 190 ± 71 pA) y α -AuIB ($96 \pm 4\%$, $P = 0,2023$; reducción de la corriente hasta 19 ± 7 pA) son ligeramente superiores o similares a los observados en condiciones control (**Figura 4.25**). Ello supone que los porcentajes de inhibición atribuibles a α -MII ($20 \pm 6\%$) y α -AuIB ($35 \pm 11\%$) sean ligeramente inferiores a los estimados para las células provenientes de animales control, lo que implicaría una disminución de la expresión relativa de los nAChRs $\alpha 3\beta 2^*$ y $\alpha 3\beta 4$ en las células provenientes de animales estresados. Por otra parte, la disminución de los porcentajes de inhibición atribuibles a α -MII y α -AuIB respecto a los que se obtuvieron tras la administración en solitario de dichas toxinas ($29 \pm 5\%$ en el caso de α -MII y $62 \pm 12\%$ en el caso de α -AuIB) corroboran la idea de que las células cromafines de rata expresan nAChRs $\alpha 6^*$ funcionales ($\alpha 6\beta 2^*$, sensibles a MLA y a α -MII, y $\alpha 6\beta 4^*$, sensibles a α -MII y a α -AuIB), si bien su expresión relativa (aproximadamente 8,5%) no se incrementaría respecto a la observada en los animales control.

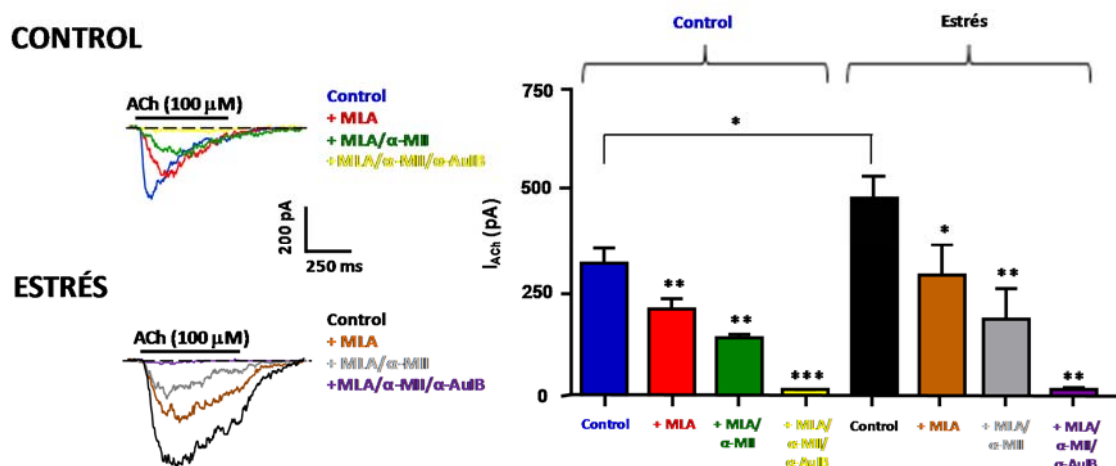


Figura 4.25. Efecto de la administración consecutiva y acumulativa de MLA, α -MII y α -AuIB sobre las corrientes inducidas por ACh en células cromafines de la glándula adrenal de rata procedentes de animales sometidos a un protocolo de estrés por frío (Estrés) y sus controles (Control). Registros representativos (panel izquierdo) y diagrama de barras (panel derecho) del efecto bloqueante de la administración de MLA (20 nM; + MLA), la subsiguiente administración de MLA y α -MII (200 nM; + MLA/ α -MII) y la posterior administración de MLA, α -MII y α -AuIB (3 μ M; + MLA/ α -MII/ α -AuIB) sobre las corrientes inducidas por ACh (100 μ M, 500 ms) en células cromafines de animales control ($n = 6$) y estresados ($n = 3$). *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$ con respecto a la condición correspondiente libre de fármaco o a los animales control.

Así mismo, evaluamos también el efecto de la administración acumulativa de α -AuIB y α -MII. La administración en primer lugar de α -AuIB (3 μ M) a células procedentes de animales control produjo una disminución del $62 \pm 5\%$ ($P < 0,0001$) de las corrientes inducidas por ACh (reducción de la amplitud de la corriente desde 318 ± 49 pA hasta 120 ± 10 pA; $n = 12$). La superfusión subsiguiente de α -AuIB (3 μ M) y α -MII (200 nM) redujo la amplitud máxima de las corrientes inducidas por ACh hasta valores de 76 ± 6 pA (inhibición del $76 \pm 3\%$; $P < 0,0001$) de la corriente inicial, en ausencia de ambas toxinas ($n = 12$). Ello implica un bloqueo adicional de las corrientes inducidas por ACh con respecto al producido por α -AuIB del $14 \pm 3\%$, que presumiblemente se ejercería exclusivamente sobre los nAChRs $\alpha 3(\alpha 6)\beta 2$. Este porcentaje de inhibición es claramente inferior al observado tras la administración de α -MII sola ($30 \pm 4\%$), lo que reflejaría la existencia de nAChRs heteroméricos complejos ($\alpha 3\beta 2\beta 4$ y/o $\alpha 6\beta 4^*$) sensibles a ambas toxinas, además de los $\alpha 3\beta 4$ y $\alpha 3\beta 2$ (**Figura 4.26**). En las células cromafines procedentes de animales estresados se observó un incremento de la amplitud de las corrientes nicotínicas (837 ± 50 pA; $n = 4$) sin que se viera acompañado de cambios significativos de los componentes sensibles a α -AuIB ($62 \pm 12\%$; $P = 0,0013$; $n = 4$) y a α -MII ($80 \pm 4\%$; $P = 0,0318$) (**Figura 4.26**). Estos resultados ponen de manifiesto la disminución del efecto bloqueante de α -MII cuando se administra combinada con α -AuIB (el porcentaje de inhibición de la corriente producido por α -MII administrada en solitario es del $29 \pm 5\%$), lo que confirmaría la expresión de nAChRs heteroméricos complejos ($\alpha 3\alpha 6^*$, $\alpha 6\beta 4^*$ y $\beta 2\beta 4^*$) también en las células cromafines provenientes de animales estresados.

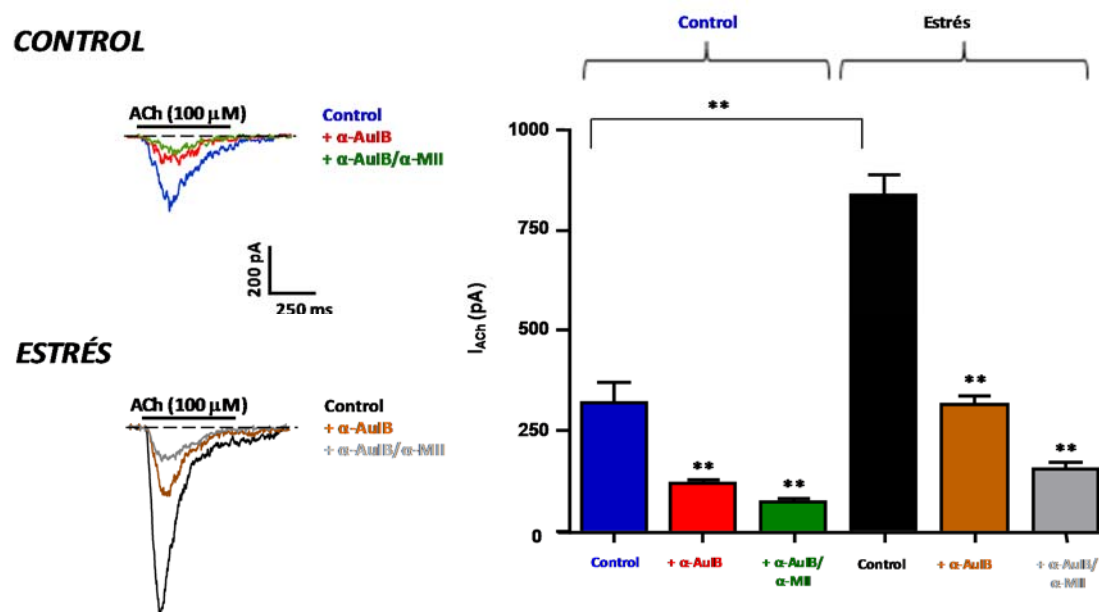


Figura 4.26. Efecto de la administración consecutiva y acumulativa de α -AuIB y α -MII sobre las corrientes inducidas por ACh en células cromafines de la glándula adrenal de ratas procedentes de animales sometidos a un protocolo de estrés por frío (Estrés) y sus controles (Control). Registros representativos (panel izquierdo) y diagrama de barras (panel derecho) del efecto bloqueante de la administración de α -AuIB (3 μ M; + α -AuIB) y de la subsiguiente administración de α -AuIB y α -MII (200 nM; + α -AuIB/ α -MII) sobre las corrientes inducidas por ACh (100 μ M, 500 ms) en células cromafines de animales control (n = 12) y estresados (n = 4). *, P < 0,05; ** P < 0,01 con respecto a la condición correspondiente libre de fármaco o a los animales control.

Los principales resultados relativos a la caracterización farmacológica de los nAChRs en células cromafines aisladas de la médula adrenal de ratas obtenidas a un protocolo de estrés por frío y sus controles aparecen recogidos en el ANEXO III.

4.3.3. Caracterización farmacológica de los nAChRs de las células cromafines de rata en cortes de la glándula adrenal de animales control y sometidos a un modelo experimental de estrés por frío

Si bien razones de tipo farmacocinético (facilidad de perfusión y lavado de las toxinas), técnico (posibilidad de administrar varios fármacos agonistas y antagonistas en una misma preparación) y de disponibilidad de material biológico (un cultivo de células cromafines a partir de un único animal posibilita la obtención de varias decenas de preparaciones – cubreobjetos – utilizables durante 1-2 días) motivaron que la caracterización farmacológica de los nAChRs de las células cromafines de la rata se realizase en cultivos de células, consideramos necesario confirmar nuestros principales hallazgos en cortes de la glándula adrenal de animales control y estresados. Nuestros esfuerzos se centraron en la caracterización de la contribución de los nAChRs constituidos

por las subunidades $\alpha 7$, $\alpha 9$ y $\alpha 10$ a las corrientes nicotínicas. La primera herramienta farmacológica utilizada fue el PNU282987 (30 μ M). Al igual que se observó en las células cromafines aisladas de animales control, la administración de este compuesto no indujo respuesta de corriente alguna en células cromafines en cortes de la glándula adrenal del mismo tipo de animales ($n = 6$ células, 2 ratas; resultados no mostrados), si bien en las procedentes de animales estresados logró activar corrientes de 8 ± 2 pA, que se vieron potenciadas en presencia del PNU120596 (1 μ M) (25 ± 4 pA; $n = 6$ células, 2 ratas) (**Figura 4.27**). Estos resultados demuestran el aumento de la expresión de nAChRs homoméricos $\alpha 7$ en las células cromafines procedentes de animales expuestos a un modelo de estrés crónico por frío.

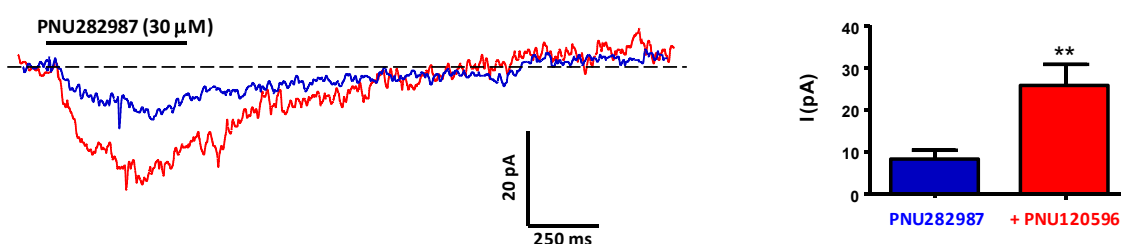


Figura 4.27. Corrientes iónicas inducidas por PNU282987 en células cromafines en cortes de glándulas adrenales procedentes de ratas sometidas a un protocolo de estrés por frío. Registro representativo y diagrama de barras de las corrientes inducidas por PNU282987 (30 μ M) en ausencia (trazo azul) o en presencia (trazo rojo) del modulador alostérico PNU120596 (1 μ M; + PNU120596) ($n = 6$). La línea discontinua horizontal de la parte superior de los registros denota el nivel de corriente instantes antes de administrar el PNU282987. $V_h = -70$ mV. **, $P < 0,01$ con respecto a PNU282987.

A continuación, evaluamos el efecto de la α -ArIB (50 nM) sobre las corrientes nicotínicas inducidas por ACh administrada a la concentración de 100 μ M. En consonancia con lo observado en células cromafines en cultivo, se constató un incremento de la amplitud de las corrientes nicotínicas de las células cromafines en cortes de la glándula adrenal de animales estresados (658 ± 103 pA; $n = 8$ células, 4 ratas) en relación a sus controles (490 ± 77 pA; $n = 9$ células, 1 rata). Así mismo, la reducción de la corriente subsiguiente a la incubación con α -ArIB fue proporcionalmente mayor en las células procedentes de animales estresados (503 ± 123 pA; bloqueo del $25 \pm 4\%$; $P < 0,0001$) que en las de los controles (419 ± 59 pA; bloqueo del $12 \pm 3\%$; $P < 0,0001$) (**Figura 4.28**). Estos resultados confirman a nivel tisular el aumento de la expresión absoluta y relativa de nAChRs $\alpha 7^*$ funcionales en las células cromafines de la médula adrenal de ratas sometidas a un protocolo de estrés crónico por frío.

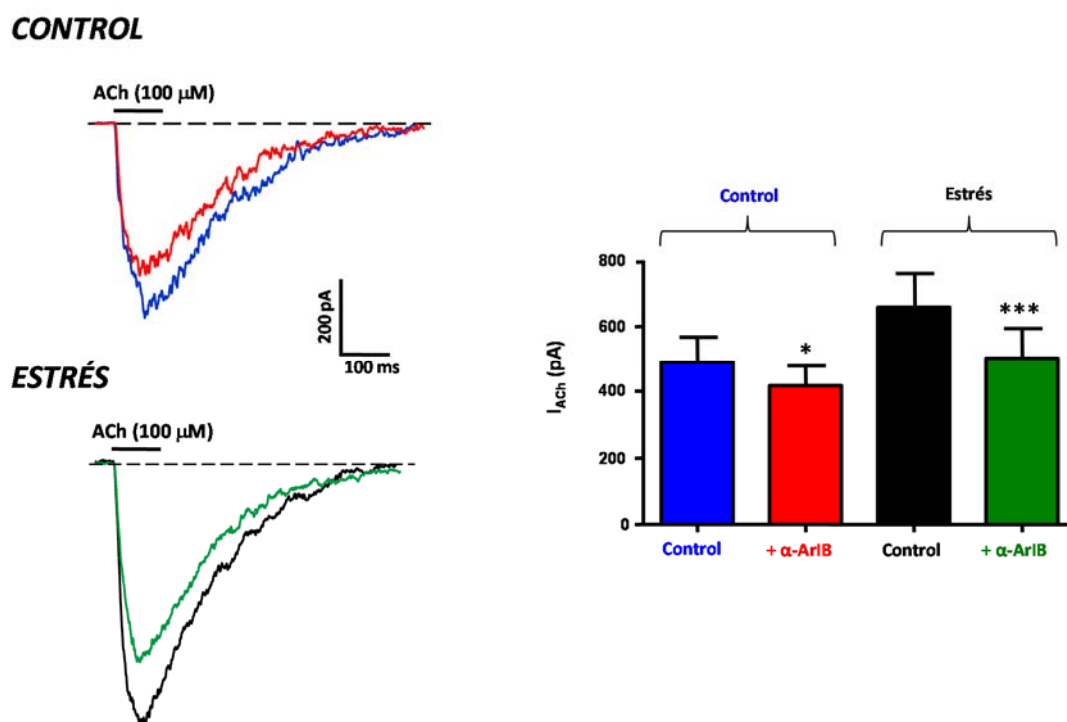


Figura 4.28. Efecto de la α -ArIB sobre las corrientes inducidas por ACh en células cromafines en cortes de glándulas adrenales procedentes de animales sometidos a un protocolo de estrés por frío (Estrés) y sus controles (Control). Registro representativo y diagrama de barras del efecto bloqueante de la α -ArIB (50 nM) sobre las corrientes inducidas por ACh (100 μ M, 100 ms) en células cromafines de animales control (n = 9) y estresados (n = 8). V_h = -70 mV. *, $P < 0,05$; ***, $P < 0,001$ con respecto a la condición control correspondiente.

El empleo de α -RgIA (200 nM) permitió evidenciar una reducción del $20 \pm 3\%$ ($P < 0,0001$) de la amplitud máxima de las corrientes generadas por ACh (435 ± 49 pA y 359 ± 51 pA en ausencia y en presencia de α -RgIA, respectivamente; n = 20 células, 6 ratas) en células cromafines en cortes de la glándula adrenal de animales control. En animales estresados se observó un aumento de la amplitud de las corrientes nicotínicas (650 ± 135 pA) y del efecto de la α -RgIA sobre las mismas (429 ± 90 pA; bloqueo del $32 \pm 7\%$; n = 7 células, 4 ratas; $P < 0,0001$). Estos resultados sugieren un aumento de la expresión absoluta y relativa de nAChRs formados por las subunidades $\alpha 9$ y/o $\alpha 10$ en nuestro modelo experimental de estrés (**Figura 4.29**).

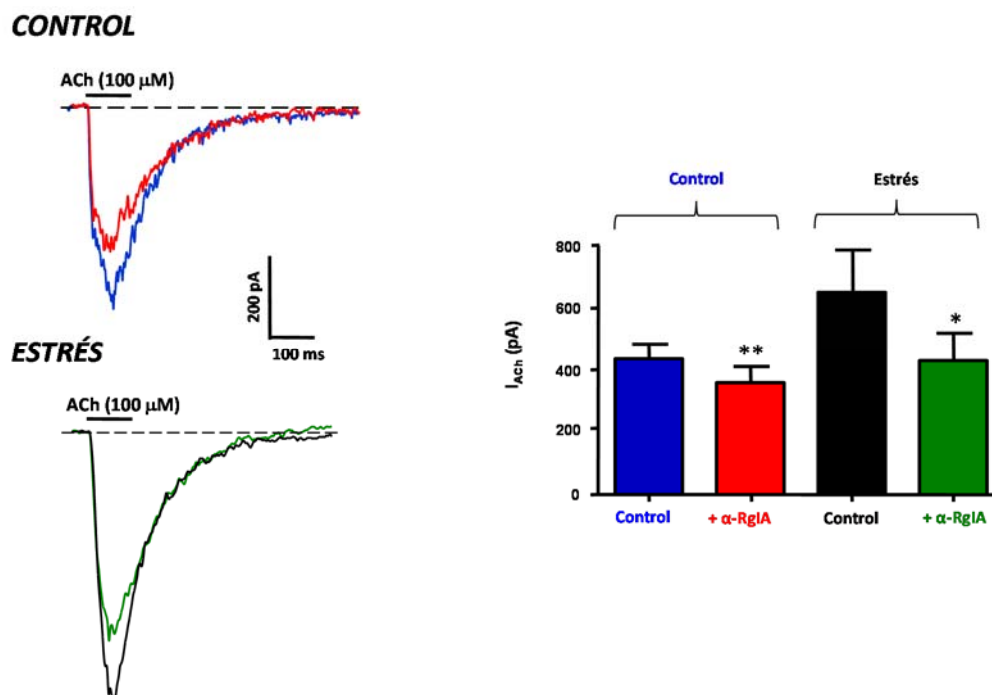


Figura 4.29. Efecto de la α -RgIA sobre las corrientes inducidas por ACh en células cromafines en cortes de glándulas adrenales procedentes de animales sometidos a un protocolo de estrés por frío (Estrés) y sus controles (Control). Registro representativo y diagrama de barras del efecto bloqueante de la α -RgIA (200 nM) sobre las corrientes inducidas por ACh (100 μ M, 100 ms) en células cromafines en animales control ($n = 20$) y estresados ($n = 7$). *, $P < 0,05$ con respecto a la condición control correspondiente.

Finalmente, decidimos investigar el efecto de la coadministración de α -RgIA (200 nM) y α -ArIB (50 nM) sobre las corrientes inducidas por ACh (100 μ M) en células cromafines en cortes de la glándula adrenal procedentes de animales estresados. Esta combinación de toxinas redujo en un $29 \pm 4\%$ ($P < 0,0001$) la amplitud de la corriente nicotínica (desde 531 ± 119 pA hasta 386 ± 97 pA; $n = 8$ células, 4 ratas) (**Figura 4.30**). El hecho de que la coadministración de las dos toxinas produzca porcentajes de bloqueo similares a los producidos cuando son administradas de manera independiente, sugiere que actuarían sobre una misma población de nAChRs heteroméricos formados por las subunidades $\alpha 7$ y $\alpha 9$ y/o $\alpha 10$.

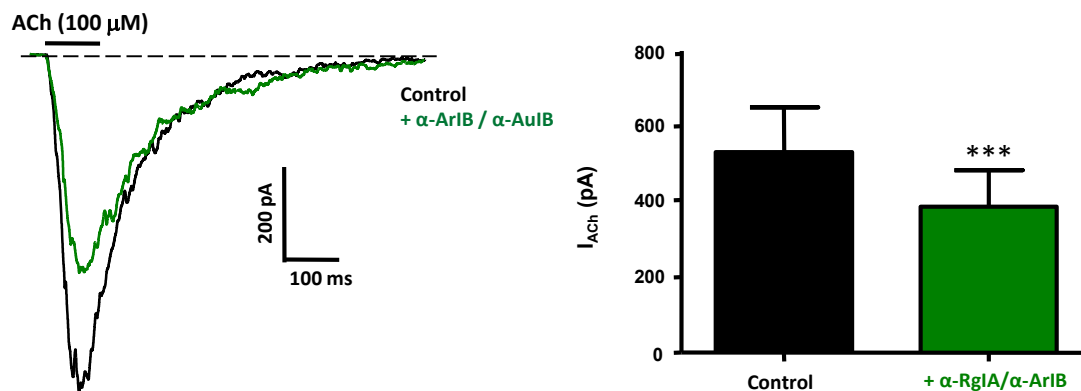


Figura 4.30. Efecto de la administración conjunta de α -RgIA y α -ArIB sobre las corrientes inducidas por ACh en células cromafines en cortes de glándulas adrenales procedentes de animales sometidos a un protocolo de estrés por frío. Registro representativo y diagrama de barras del efecto de la coadministración de la α -RgIA (200 nM) y la α -ArIB (50 nM) (+ α -RgIA/ α -ArIB) sobre las corrientes inducidas por ACh (100 μ M, 100 ms) en las células cromafines de animales estresados (n = 8). ***, $P < 0,001$ con respecto al control en ausencia de ambas toxinas.

4.3.4. Caracterización farmacológica de los nAChRs de las terminaciones del nervio esplácnico en cortes de la glándula adrenal de animales sometidos a un modelo experimental de estrés por frío

Las sEPSCs espontáneas reflejan la liberación cuantál de neurotransmisores excitadores independientemente del disparo de potenciales de acción. No obstante, la frecuencia de las sEPSCs sí puede ser modulada por receptores presinápticos. La ocurrencia de sEPSCs en las células cromafines en cortes de la glándula adrenal de animales control es notablemente rara, siendo observadas en no más del 5% de las células. Sin embargo, la probabilidad de observar esta forma de actividad sináptica aumenta considerablemente (15 - 20%) en los registros que se llevan a cabo en cortes de glándulas procedentes de animales estresados por frío, probablemente como consecuencia de la profunda remodelación del tejido adrenomedular y, en particular, del aumento de la inervación colinérgica que ocurre durante el estrés crónico (Colomer y col., 2008a). Esta circunstancia posibilitó que se investigara la presencia de autoreceptores nicotínicos en las terminaciones del nervio esplácnico. Así, estudios previos (Martin y col., 2003; Colomer y col., 2008b; Colomer y col., 2010) pusieron de manifiesto la capacidad de la α -BgTx y de la α -RgIA para reducir la frecuencia y amplitud de las sEPSCs de las células cromafines en cortes de la glándula adrenal de la rata, lo que fue considerado como evidencia de la existencia de nAChRs presinápticos, formados por las subunidades $\alpha 7^*$, $\alpha 9^*$ y/o $\alpha 10^*$, facilitadores de la liberación de ACh. Una vez conocida la existencia de autorreceptores nicotínicos cabe plantearse la pregunta de si al igual que existen nAChRs postsinápticos formados por las subunidades $\alpha 7$ y $\alpha 9$ y/o $\alpha 10$, también este tipo de nAChRs

heteroméricos puede localizarse presinápticamente. Para ello decidimos evaluar el efecto combinado de la α -RgIA y la α -ArIB sobre las sEPSCs.

La incubación simultánea con α -RgIA (200 nM) y α -ArIB (50 nM) produjo una reducción del $88 \pm 5\%$ ($P = 0,1041$) de la frecuencia absoluta (desde $0,12 \pm 0,03$ Hz hasta $0,017 \pm 0,01$ Hz) de las sEPSCs, y del $31 \pm 2\%$ ($P < 0,0001$) de la amplitud de las mismas (desde $53,4 \pm 9,60$ pA hasta $36,7 \pm 6,4$ pA; $n = 4$ células) (**Figura 4.31**).

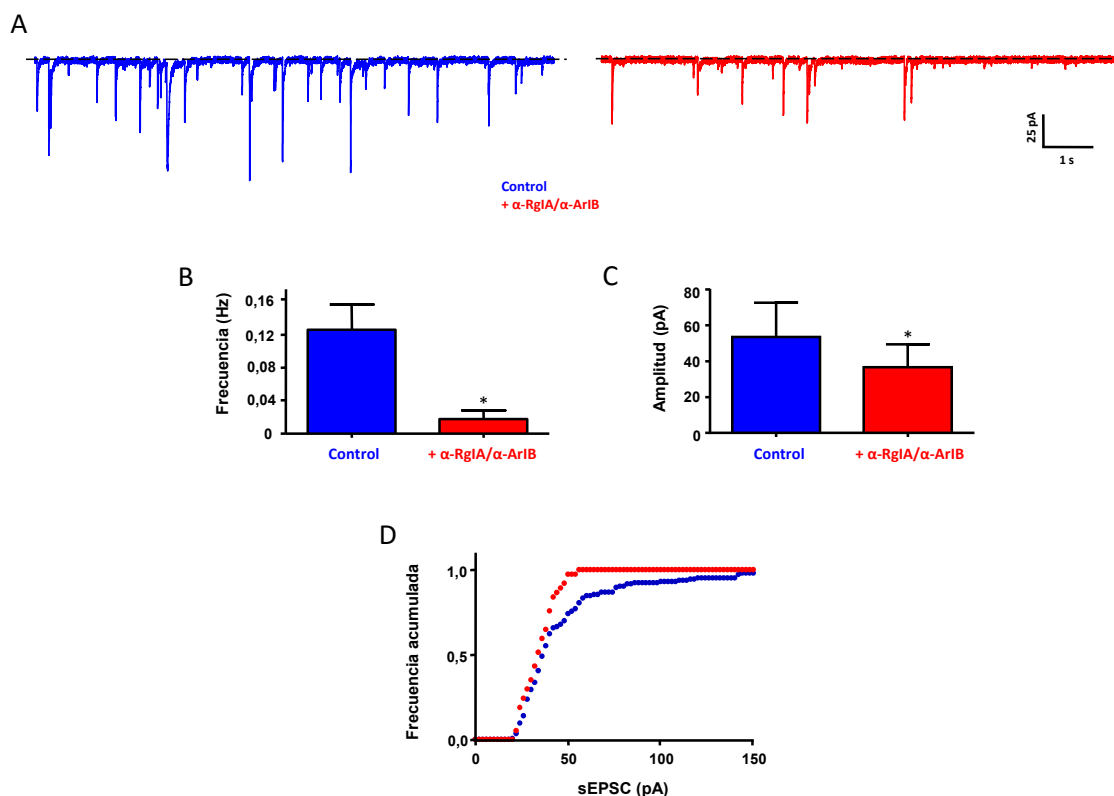


Figura 4.31. Efecto de la administración conjunta de α -RgIA y α -ArIB sobre las sEPSCs en células cromafines en cortes de la glándula adrenal de animales sometidos a un protocolo de estrés por frío. **A.** Registro de sEPSCs en ausencia (Control) y en presencia de α -RgIA (200 nM) y α -ArIB (50 nM; + α -RgIA/ α -ArIB). **B.** Diagrama de barras del efecto de α -RgIA/ α -ArIB sobre la frecuencia de las sEPSCs. La frecuencia absoluta fue evaluada durante 4 minutos en cada condición. **C.** Diagrama de barras del efecto de α -RgIA/ α -ArIB sobre la amplitud de las EPSCs ($n = 4$ células). Los datos representados en B y C son las medias de los resultados obtenidos en 4 células, en las que se analizaron un total de 201 sEPSCs en condiciones control y 47 en presencia de la combinación de toxinas. **D.** Distribuciones de frecuencias acumuladas de las amplitudes de las EPSCs en ausencia (azul) y en presencia (rojo) de α -RgIA/ α -ArIB en una célula representativa. *, $P < 0,05$ con respecto al control en ausencia de ambas toxinas.

Así mismo, el análisis de las distribuciones de frecuencias acumuladas de las amplitudes de las sEPSCs muestra una disminución de las sEPSCs de mayor tamaño en presencia de la combinación de toxinas, lo que sería indicativo de una reducción de la probabilidad de liberación de cuantos de ACh por las terminaciones del nervio esplácnico. En conjunto, los resultados obtenidos con la combinación de dichas toxinas no difieren cuantitativamente (inhibición del $62 \pm 8\%$ de la frecuencia y del $32 \pm 4\%$ de la amplitud de las sEPSCs) (Colomer y col., 2010) ni cualitativamente (disminución de las sEPSCs de mayor tamaño) (Olivos-Oré, 2009) de los que se obtienen tras la administración de

la α -RgIA sola, lo que sugiere que también a nivel presináptico podrían localizarse nAChRs funcionales formados por las subunidades $\alpha 7$ y $\alpha 9$ y/o $\alpha 10$. Como hemos comprobado en las células cromafines, estos receptores pueden coexistir con los nAChRs homoméricos $\alpha 7$, particularmente en condiciones de estrés. Ello condujo a evaluar el efecto del PNU120596 (1 μ M), un modulador alostérico de los nAChRs $\alpha 7$, sobre la frecuencia y amplitud de las sEPSCs (**Figura 4.32**). Este compuesto no modificó ($P < 0,0001$) la frecuencia instantánea de las sEPSCs ($2,06 \pm 0,18$ Hz y $1,76 \pm 0,15$ Hz; en ausencia y presencia del modulador, respectivamente), si bien aumentó de forma significativa ($P < 0,0001$) la amplitud de las mismas (desde $29 \pm 0,8$ pA hasta $47 \pm 2,3$ pA). Estos resultados sugieren que a nivel presináptico se ubicarían también nAChRs homoméricos $\alpha 7$ capaces de incrementar la liberación de ACh por las terminaciones del nervio esplácnico, contribuyendo a la potenciación de la transmisión sináptica (más concretamente, previniendo la depresión sináptica) en condiciones de estrés.

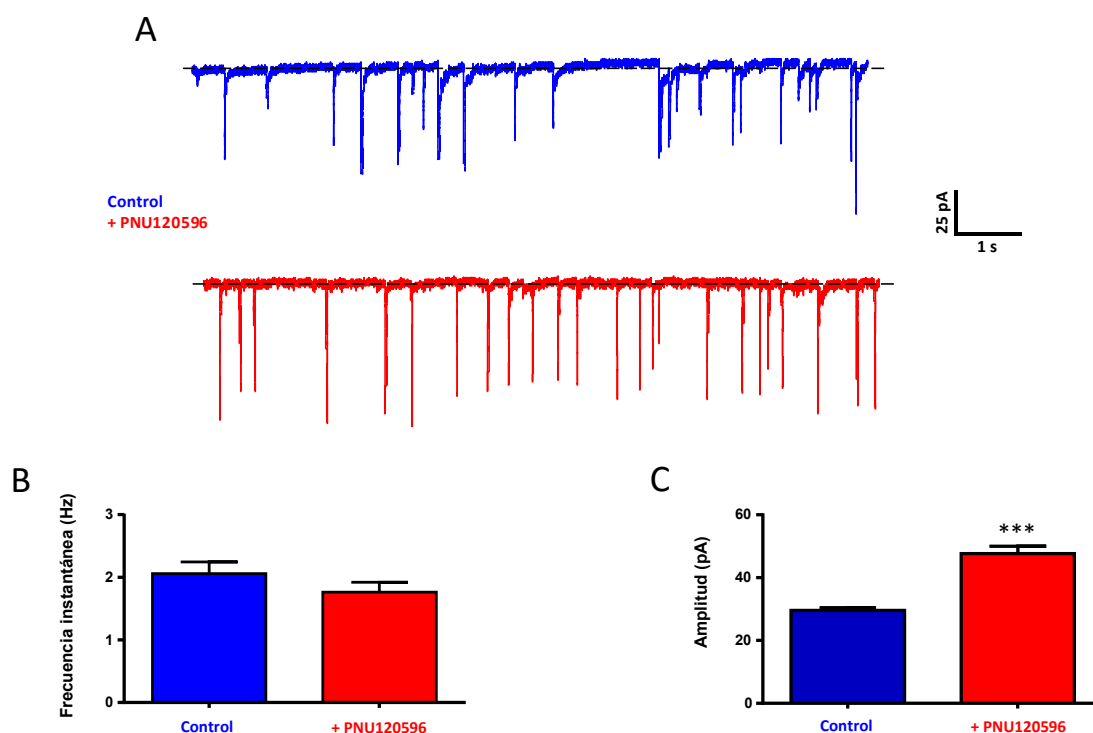


Figura 4.32. Efecto de la administración de PNU120596 sobre las sEPSCs en células cromafines en cortes de la glándula adrenal procedentes de animales sometidos a un protocolo de estrés por frío. **A.** Registro de sEPSCs antes (Control) y durante la administración de PNU120596 (1 μ M). **B.** Diagrama de barras representativo del efecto del PNU120596 (1 μ M) sobre la frecuencia instantánea de las sEPSCs ($n = 1$ célula). La frecuencia instantánea fue evaluada durante 1 minuto en cada condición. **C.** Diagrama de barras representativo del efecto del PNU120596 (1 μ M) sobre la amplitud de las sEPSCs ($n = 1$ célula). Los datos representados en **B** y **C** fueron obtenidos del análisis de 74 sEPSCs en condiciones control y 67 en presencia de PNU120596. ***, $P < 0,001$ con respecto al control en ausencia de PNU120596.

4.4. LA ESTIMULACIÓN ELÉCTRICA DE CAMPO EN CORTES DE LA GLÁNDULA ADRENAL DE RATA

La estimulación eléctrica de campo en cortes de tejido adrenomedular permite despolarizar las terminaciones de las fibras del nervio esplácnico (Hanse y Gustafsson, 2001) dando lugar a fEPSPs en las células cromafines. Estas respuestas son el resultado de la activación por la ACh de nAChRs de localización sináptica con la consiguiente generación de una corriente iónica que medida en condiciones de fijación de voltaje adopta la forma de una fEPSC o EPSC. El número de terminaciones nerviosas que se recluta es función de la intensidad del estímulo aplicado (Guzmán y col., 2003). No obstante, la estimulación eléctrica de campo es también capaz de desencadenar una respuesta de las células cromafines por despolarización directa de su membrana (Wakade, 1981; Wakade y Wakade, 1982; Walsh y col., 2011).

Dado que las células cromafines presentaron un V_r de -55 ± 2 mV ($n = 18$), en esta serie de experimentos utilizamos un potencial de compensación (V_{comm}) de -60 mV y un V_h de -60 mV, dependiendo de si se empleaba el modo de registro de fijación de corriente o de voltaje. En nuestra experiencia, la ubicación de los electrodos y la intensidad del estímulo son los factores que determinan el mecanismo implicado en la respuesta de la célula cromafín a la estimulación eléctrica. Cuando la separación de los electrodos es pequeña (~ 50 μ m) y la célula objeto de estudio se sitúa entre ellos, la aplicación de un estímulo bifásico de ± 50 V, con una duración de 50 μ s en cada fase, origina una respuesta de tipo directo en la que la despolarización de la membrana celular se solapa con el artefacto de estimulación (**Figura 4.33A**). En cambio, si se aumenta la separación de los electrodos hasta ~ 200 μ m manteniéndolos equidistantes de la célula, el estímulo eléctrico desencadena una respuesta precedida por un periodo de latencia de 2 a 5 ms ($2,47 \pm 0,08$ ms; $n = 10$) con respecto al artefacto de estimulación. Este periodo de latencia es característico de las respuestas sinápticas (**Figura 4.33B**).

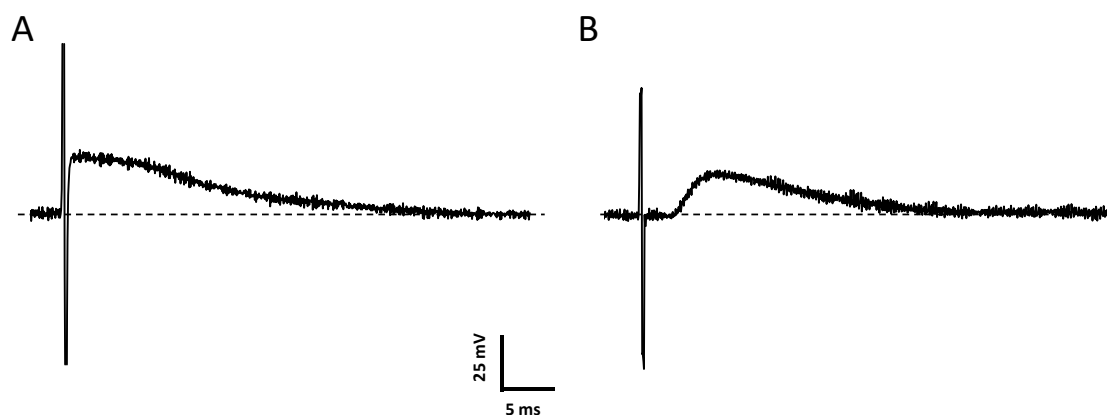


Figura 4.33. Efecto de la estimulación eléctrica de campo bifásica (± 50 V, 50 μ s en cada fase) sobre el potencial de membrana de una célula cromafín en un corte de la glándula adrenal de la rata. Se muestran dos respuestas despolarizantes obtenidas en la misma célula modificando la separación de los electrodos de estimulación. En la respuesta representada en **A** los electrodos se dispusieron en contigüidad (~ 50 μ m) de la célula en estudio, mientras que fueron alejados de ella (distancia entre los electrodos de ~ 200 μ m) para obtener la respuesta mostrada en **B**. $V_{comm} = -60$ mV.

Al objeto de confirmar la naturaleza sináptica de las respuestas obtenidas por estimulación eléctrica evaluamos el efecto de la TTX, un bloqueante de canales Na_v , y de la d-tubocurarina, un antagonista de los nAChRs. La sensibilidad de las respuestas a la d-tubocurarina es indicativa de su carácter colinérgico nicotínico, mientras que la supresión de las mismas por TTX sería compatible con el origen neural de la ACh que activaría los nAChRs. La evaluación del efecto de ambos fármacos se llevó a cabo sobre las EPSCs, dado que este tipo de respuestas obedece casi exclusivamente al flujo de iones a través de los nAChRs. Debe señalarse también que los canales Na_v se expresan tanto en las fibras del nervio esplácnico como en las células cromafines. En el nervio esplácnico el tipo mayoritario es el $\text{Na}_v1.6$ (Kayano y col., 1988; Caldwell y col., 2000), mientras que en la membrana de las células cromafines de la rata el tipo predominante es el $\text{Na}_v1.7$ (Moser, 1998; Wada y col., 2004; Morinville y col., 2007). La diferente sensibilidad de los canales $\text{Na}_v1.6$ y 1.7 a la TTX posibilita la abolición selectiva de la descarga de potenciales de acción en las fibras del nervio esplácnico cuando esta toxina se emplea a la concentración de 100 nM (Walsh y col., 2011). La **figura 4.34A y B** ilustra los resultados de un experimento en el que se evaluó el efecto de la TTX (100 nM) sobre la descarga de potenciales de acción inducidos por la inyección de corriente (registro en el modo de fijación de corriente) y sobre las EPSCs inducidas por la estimulación eléctrica de campo (registro en el modo de fijación de voltaje) en una célula cromafín de un corte de la glándula adrenal. Como puede observarse, la incubación con TTX (100 nM) apenas modificó la amplitud o frecuencia de los potenciales de acción generados por la despolarización directa de la membrana de la célula cromafín pero suprimió las EPSCs. En esta preparación es necesario emplear una concentración de 1 μM de dicha toxina para abolir las corrientes a través de los canales Na_v y el componente dependiente de la entrada de Na^+ de los potenciales de acción de las células cromafines (**Figura. 4.34C**). Así mismo, la administración de d-tubocurarina (10 μM) produce un bloqueo total de las EPSCs, lo que indicaría la participación de nAChRs en la generación de las mismas (**Figura. 4.34D**).

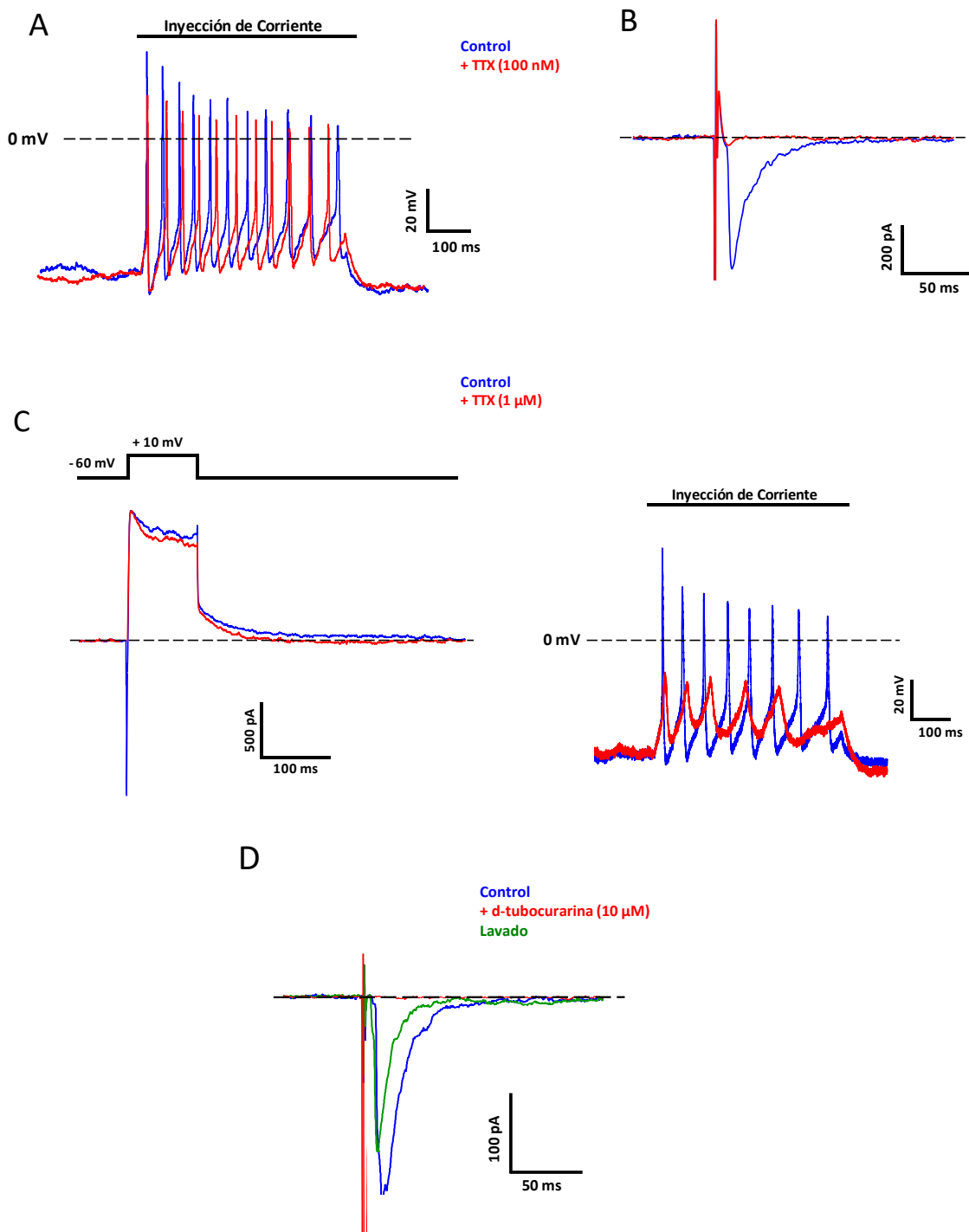


Figura 4.34. Efecto de la TTX y de la d-tubocurarina sobre las respuestas inducidas por la inyección de corriente, la aplicación de pulsos de voltaje o la estimulación eléctrica de campo en células cromafines en cortes de la glándula adrenal de rata. **A.** Registros de los cambios en el potencial de membrana inducidos por la inyección de corriente (20 pA, 500 ms) en ausencia (Control) y en presencia de TTX (100 nM, 5 min). $V_{comm} = -60$ mV. **B.** Registros de EPSCs inducidos por la estimulación eléctrica de campo (± 50 V; 50 μ s) en ausencia (Control) y en presencia de TTX (100 nM). $V_h = -60$ mV. **C.** Registros de las corrientes iónicas inducidas por la administración de un pulso despolarizante (+10 mV, 100 ms, $V_h = -60$ mV; panel izquierdo) y de los cambios en el potencial de membrana inducidos por la inyección de corriente (20 pA, 500 ms, $V_{comm} = -60$ mV; panel derecho) en una célula cromafín antes (Control) y durante la superfusión con TTX (1 μ M, 5 min). **D.** Registros de EPSCs inducidas por la estimulación eléctrica de campo (± 50 V; 50 μ s por fase) en una célula cromafín antes (Control), durante (+d-tubocurarina) y después (lavado) de la superfusión con d-tubocurarina (10 μ M, 5 min). $V_h = -60$ mV. Se muestran resultados típicos obtenidos en 3 preparaciones distintas.

Una vez confirmado el carácter neurogénico de las respuestas a la estimulación eléctrica de campo, procedimos a establecer las condiciones de estimulación más adecuadas. El primer parámetro objeto de estudio fue la intensidad del estímulo. Con ese propósito se aplicaron estímulos de intensidades crecientes desde ± 10 V hasta ± 80 V a intervalos de 10 s. El empleo de este protocolo permitió comprobar que la estimulación eléctrica induce EPSCs de un modo “todo o nada” (**Figura 4.35A**). El umbral de voltaje para la generación de EPSCs es variable en las distintas células, así como la amplitud de las EPSCs (**Figura 4.35B**). Así mismo, la ausencia de inflexiones en la fase de ascenso de las EPSCs (el tiempo de ascenso del 10 - 90% de la amplitud máxima fue de $1,6 \pm 0,1$ ms; $n = 7$) denota que las EPSCs generadas por la estimulación eléctrica se deben a la liberación de ACh por una sola fibra nerviosa. Debe señalarse que a pesar de realizar denodados esfuerzos mediante la modificación del grosor de las rodajas, el empleo de distintos tipos de electrodos (nychrom, plata-cloruro de plata y tungsteno) y la variación de los parámetros de estimulación (colocación de los electrodos, intensidad y duración del estímulo) la tasa de éxito de nuestros experimentos en relación con el desencadenamiento de respuestas sinápticas fue inferior al 5%.

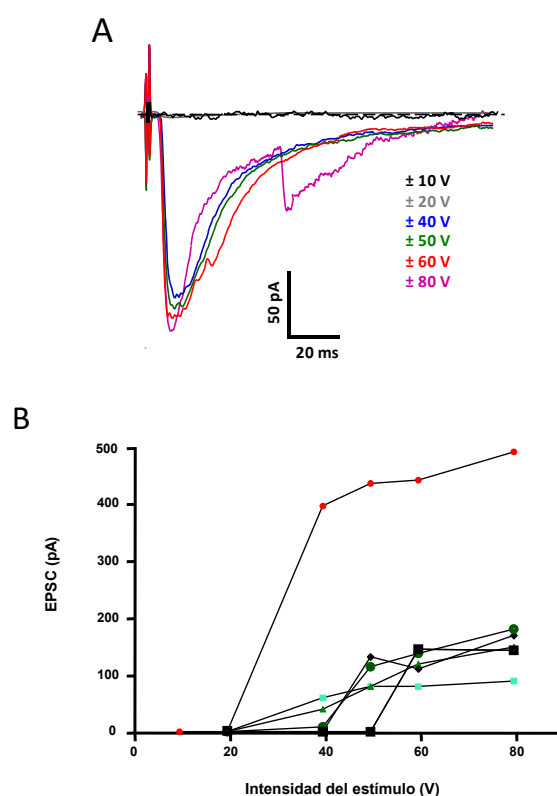


Figura 4.35. Relación entre la intensidad de la estimulación eléctrica de campo y la amplitud de las EPSCs registradas en células cromafines en cortes de la glándula adrenal de rata. **A.** EPSCs en una célula cromafín producidas por un tren de estímulos eléctricos bifásicos (50 μ s cada fase) de intensidad creciente desde ± 10 V hasta ± 80 V, administrados a intervalos de 10 s. $V_h = -60$ mV. **B.** Representación gráfica de la amplitud de las EPSCs en función de la intensidad del estímulo eléctrico aplicado; se muestran de forma diferenciada los resultados obtenidos en 7 células distintas.

El siguiente parámetro analizado fue la frecuencia de estimulación. En este caso, el protocolo utilizado consistió en la aplicación de trenes de estímulos (5 - 10 estímulos por tren) a frecuencias crecientes, evaluándose la respuesta de corriente (EPSCs; 0,1 Hz; 0,5 Hz y 1 Hz) o la respuesta de potencial (EPSPs; 0,5 Hz y 1 Hz) en células en las que previamente se había constatado la presencia de EPSCs inducidas por la estimulación eléctrica (**Figuras 4.36A y 4.37**). La **figura 4.36B** muestra las amplitudes de las EPSCs normalizadas respecto a la primera respuesta del tren para las frecuencias de 0,1 Hz; 0,5 Hz y 1 Hz. Aunque la probabilidad de obtener una EPSC durante un tren fue elevada ($> 0,7$; **Figura 4.36C**) a las tres frecuencias de estimulación, la amplitud de las corrientes mostró variaciones importantes dentro de un mismo tren, siendo las mismas más acusadas a las frecuencias de 0,5 Hz y 1 Hz. Ello puede ser debido, en parte, a la existencia de EPSCs asincrónicas respecto al estímulo (EPSCs con latencia elevada) con la consiguiente modificación de la eficacia sináptica (cambios en la probabilidad de liberación de las vesículas sinápticas, del número de sitios de exocitosis y/o del número y actividad de los nAChRs postsinápticos) ante la estimulación repetida. Esta actividad asincrónica fue detectada a la frecuencia de 0,5 Hz (aparición de dos EPSCs tras cada estímulo) y alcanzó mayor importancia a la de 1 Hz (aparición de tres y cuatro respuestas tras cada estímulo) (**Figura 4.36C**).

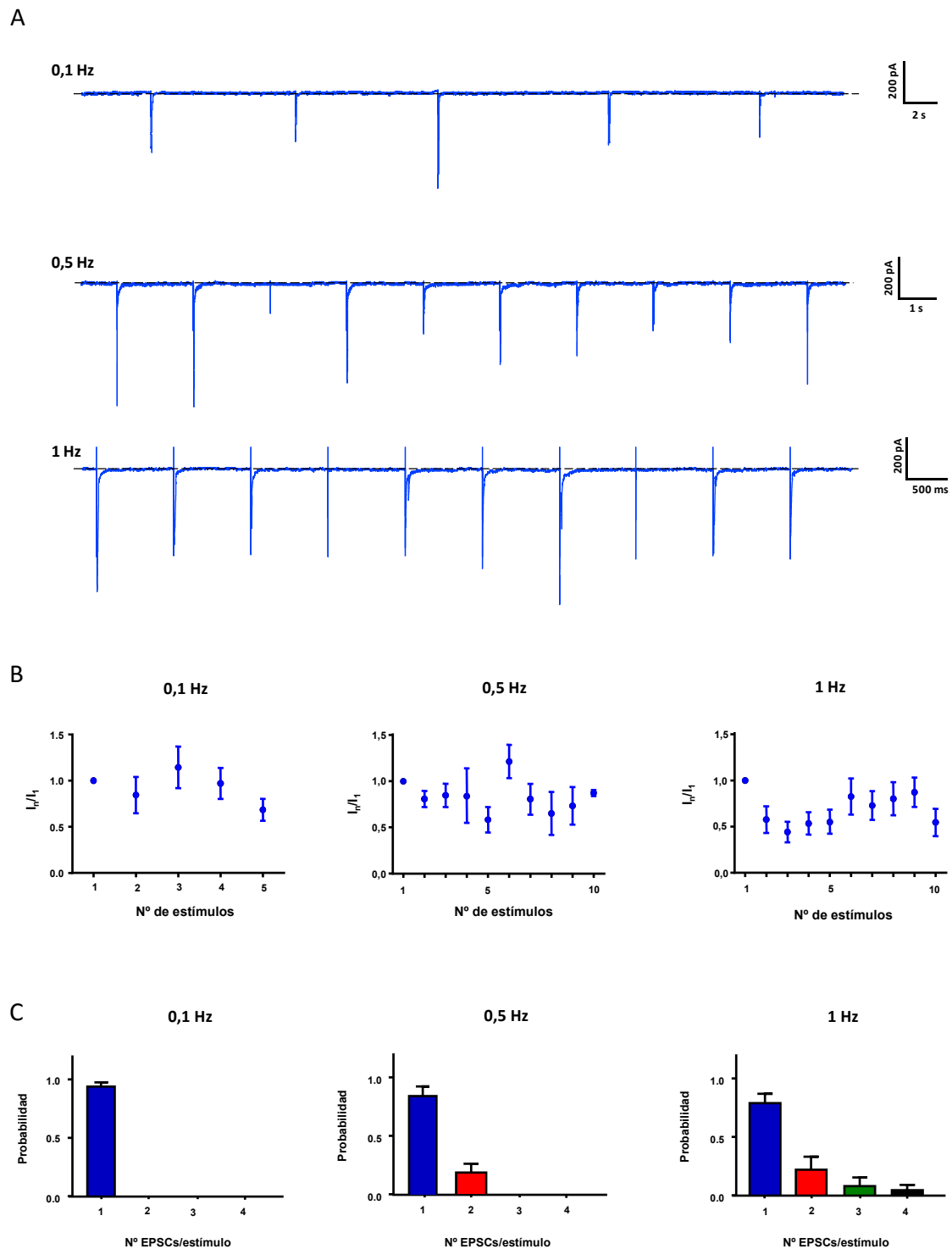


Figura 4.36. Efecto de la frecuencia de la estimulación eléctrica de campo sobre la amplitud y probabilidad de aparición de EPSCs de las células cromafines en cortes de la glándula adrenal de la rata. **A.** Registros representativos de EPSCs a las frecuencias de estimulación de 0,1; 0,5 y 1 Hz. $V_h = -60$ mV. Notese que a las escalas de tiempo utilizadas el artefacto de estimulación se confunde en ocasiones con las EPSCs. **B.** Amplitudes de las EPSCs normalizadas respecto a la primera EPSC de un tren de 5 (0,1 Hz) ó 10 (0,5 Hz y 1 Hz) estímulos. $n = 8$ (0,1 Hz), 6 (0,5 Hz) y 9 (1 Hz). **C.** Probabilidad de aparición de EPSCs en función de la frecuencia de estimulación. Se indica la probabilidad media durante el tren de aparición de EPSCs a las tres frecuencias empleadas (0,1 Hz, 0,5 Hz y 1 Hz). La probabilidad fue estimada como el número de EPSCs dividido por el número de estímulos y se representó para las distintas respuestas que podían observarse tras cada estímulo. La primera respuesta debía presentar una latencia inferior a 5 ms respecto al estímulo eléctrico. $n = 8$ (0,1 Hz), 6 (0,5 Hz) y 9 (1 Hz).

La probabilidad de inducir EPSPs fue similar ($> 0,7$) a la observada para las EPSCs a las mismas frecuencias de estimulación (0,5 Hz y 1 Hz) (**Figura 4.37C**). La amplitud media de los EPSPs durante la primera respuesta del tren a 0,5 Hz y 1 Hz fue de $11,96 \pm 2,92$ mV ($n = 7$) y $11,1 \pm 1,6$ mV ($n = 7$), respectivamente, y se mantuvo estable a lo largo del tren en contraste con el comportamiento mostrado por las EPSCs (**Figura 4.37B**). El 75% de los EPSPs inducidos por la estimulación eléctrica a la frecuencia a 0,5 Hz presentó potenciales de acción superpuestos, si bien este porcentaje disminuyó hasta \sim el 60% a la frecuencia de 1 Hz (**Figura 4.37C**), y a 40% a la frecuencia de 10 Hz. Ello podría explicarse no solo por la mayor frecuencia de estimulación sino también por la aparición de EPSPs asincrónicos con el aumento de la frecuencia (resultados no mostrados) Como ya se ha mencionado, la frecuencia de descarga de potenciales de acción y la duración (número de potenciales) de dicha descarga son los principales factores determinantes de la respuesta secretora de CAs por las células cromafines (Zhou y Misler, 1995; Duan y col., 2003). La probabilidad de que se dispare un potencial de acción depende del periodo refractario de los canales Na_v , el cual se verá afectado por la amplitud y la duración de los EPSPs, así como por el intervalo entre ellos (frecuencia de estimulación). Nuestros resultados indican que la amplitud de los EPSPs es independiente de la frecuencia de estimulación (a las bajas frecuencias utilizadas en este trabajo), por lo que la duración y frecuencia de los EPSPs podría ser el factor determinante de la probabilidad de aparición de potenciales de acción. Como analizaremos en las secciones siguientes, la morfología de las EPSCs puede variar en función de otras conductancias de la membrana de las células cromafines, entre las que se encontraría la dependiente de los canales SK.

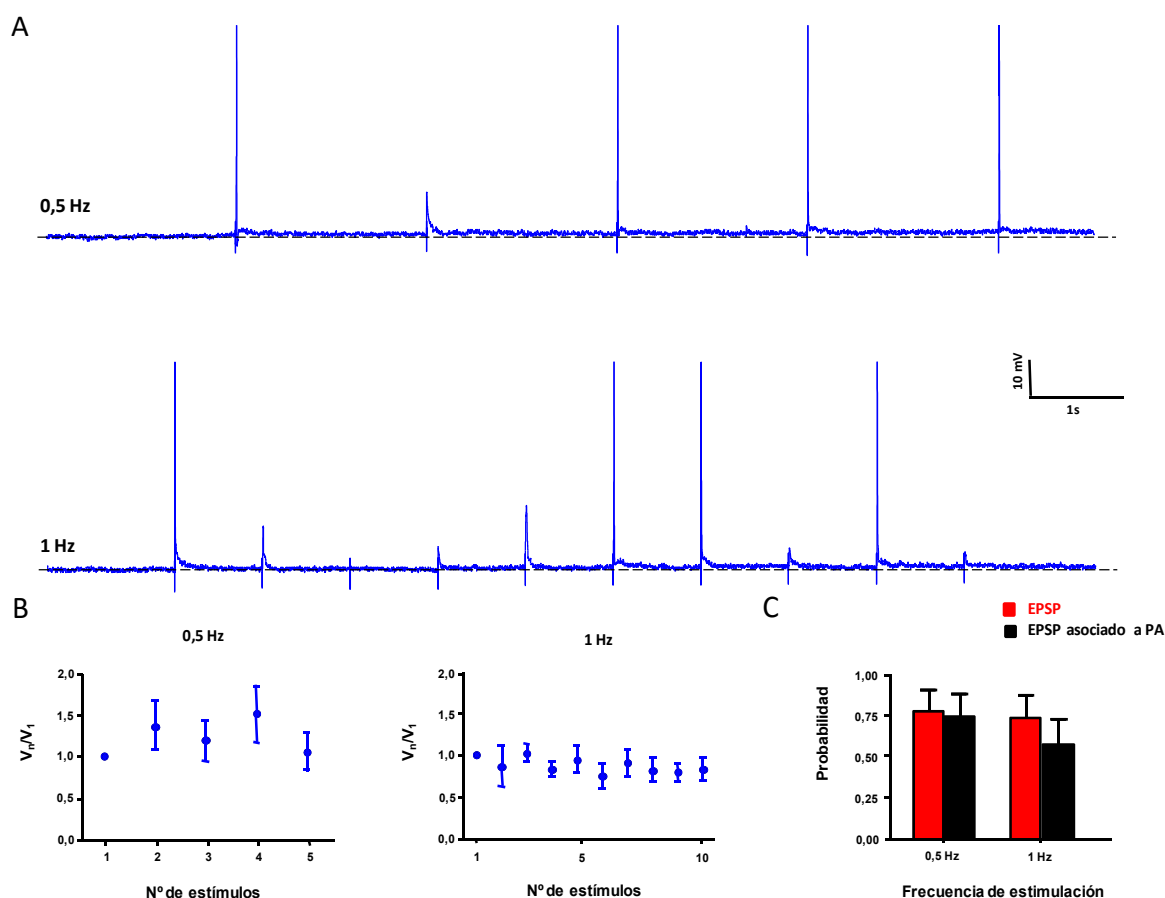


Figura 4.37. Efecto de la frecuencia de la estimulación eléctrica sobre la amplitud y probabilidad de aparición de EPSPs de las células cromafines en cortes de la glándula adrenal de la rata. **A.** Registros representativos de EPSPs a las frecuencias de estimulación de 0,5 Hz y 1 Hz. $V_{\text{comm}} = -60$ mV. Nótese la existencia de potenciales de acción superpuestos sobre algunos de los EPSPs. **B.** Amplitudes normalizadas de los EPSPs respecto a la del primer EPSP de un tren de 5 (0,5 Hz) ó 10 (1 Hz) estímulos. **C.** Probabilidad de aparición de EPSPs y de EPSPs asociados a potenciales de acción (PA) en función de la frecuencia de la estimulación eléctrica. La probabilidad fue estimada como el número de EPSPs aislados o asociados a potenciales de acción dividido por el número de estímulos del tren. $n = 7$.

4.5. ACOPLAMIENTO FUNCIONAL ENTRE LOS NACHRS $\alpha 9\alpha 10$ Y LOS CANALES SK

4.5.1. Identificación de los canales SK en células cromafines en cortes de la glándula adrenal de rata

El objetivo fundamental de esta sección fue la investigación del posible acoplamiento entre la actividad de los nAChRs, en particular los de tipo $\alpha 9^*$ y/o $\alpha 10$, y la de los canales SK. Estos canales, cuya presencia y propiedades han sido bien caracterizados en las células cromafines de diversas especies animales (Marty, 1981; Neely y Lingle, 1992; Artalejo y col., 1993; Vandael y col., 2012), se activan en respuesta a la elevación de la $[Ca^{2+}]_i$ favoreciendo la salida de K^+ y, en consecuencia, produciendo un cambio en sentido hiperpolarizante del potencial de membrana. Los canales SK destacan por su elevada sensibilidad al Ca^{2+} al potencial de reposo de la célula, lo que les

permite contribuir a la AHP de los potenciales de acción y ser responsables de la hiperpolarización que sigue a la activación de los nAChRs $\alpha 9\alpha 10$ en las células del epitelio sensitivo de la cóclea (Housley y Ashmore, 1991; Fuchs y Murrow, 1992; Blanchet y col., 1996; Yuhás y Fuchs, 1999; Oliver y col., 2000; Elgoyhen y col., 2001).

Al objeto de verificar la presencia de los canales SK en las células cromafines de rata en cortes de la glándula adrenal procedimos al registro de corrientes a través de canales SK activados por la elevación de la $[Ca^{2+}]_i$ inducida por la entrada de Ca^{2+} a través de canales Ca_v . En células cromafines dializadas con una solución intracelular rica en Cs^+ los canales Ca_v median corrientes de entrada escasamente inactivantes (amplitud máxima de 139 ± 64 pA; $n = 3$) cuando se aplica un pulso despolarizante de breve duración (100 ms, +10 mV). La sensibilidad de dichas corrientes al Cd^{2+} (100 μM), administrado extracelularmente, permite confirmar la intervención de los canales Ca_v (**Figura 4.38A**). Por otra parte, en células dializadas con una solución intracelular conteniendo K^+ como catión principal, la aplicación de un pulso despolarizante de características similares (+10 mV, 100 ms) al anterior pero seguido de una fase de 400 ms al potencial de -40 mV antes de retornar al V_h de -70 mV, indujo corrientes de salida de 1.490 ± 529 pA y de 68 ± 26 pA durante las dos fases despolarizantes (+10 mV y -40 mV) del mismo, respectivamente ($n = 5$). A fin de conocer la contribución relativa de los canales BK y de los SK a las corrientes de salida activadas por la despolarización de la membrana, recurrimos al empleo de fármacos bloqueantes selectivos de los mismos. La paxilina (5 μM), un bloqueante de los canales BK (Knaus y col., 1994), produjo un bloqueo del $82,5 \pm 9\%$ ($n = 4$) de la corriente durante la primera fase del pulso despolarizante así como durante las primeras etapas de la segunda fase, en consonancia con la dependencia de voltaje de la activación de los canales BK y su lenta desactivación al potencial de -40 mV. Por su parte, la apamina, un bloqueante selectivo de los canales SK (Banks y col., 1979), produjo una reducción discreta de la corriente durante la primera fase del pulso despolarizante y abolió la corriente al final de la segunda fase del mismo ($n = 4$), lo que indicaría que la corriente mediada por los canales SK es la corriente de K^+ dependiente de Ca^{2+} dominante al potencial de reposo de la célula cromafín (**Figura 4.38B**).

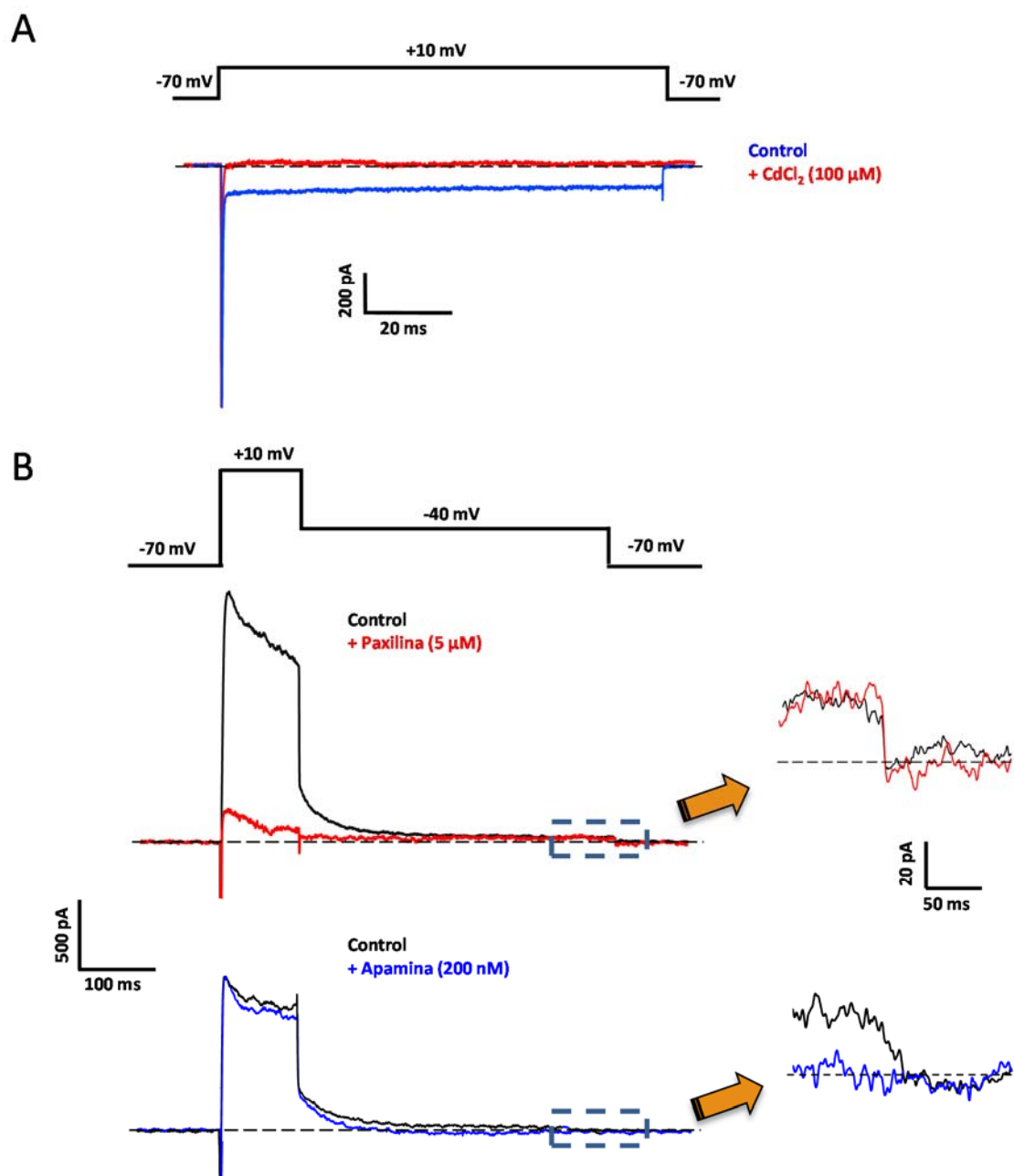


Figura 4.38. Corrientes iónicas activadas por la despolarización de la membrana de las células cromafines en cortes de la glándula adrenal de la rata. **A.** Registro de corrientes de Na^+ y Ca^{2+} inducidas por la despolarización de la membrana celular (+10 mV, 100 ms). La solución intracelular contiene como principal catión al Cs^+ , poco permeable a través de los canales de K^+ , lo que permite aislar la corriente a través de los canales Ca_v . La administración de Cd^{2+} presente en el medio extracelular bloquea la corriente a través de los canales Ca_v preservándose la corriente a través de los canales Na_v . Solución extracelular (mM): NaCl 145, KCl 2,8, CaCl_2 2, MgCl_2 2, HEPES 10, glucosa 10; pH ajustado a 7,2 con HCl o NaOH (~300 mOsm); solución intracelular (mM): CsCl 140, EGTA 10, ATP. Na_2 2, GTP. Li_2 0,3, HEPES 10; pH ajustado a 7,2 con CsOH (~280 mOsm). $V_h = -70$ mV. **B.** Efecto de paxilina (5 μM) y apamina (200 nM) sobre las corrientes de K^+ activadas por un pulso despolarizante bifásico (véase el protocolo de voltaje). La solución intracelular contiene como principal catión al K^+ , por lo que las corrientes de entrada de Ca^{2+} quedan ocultas por corrientes de salida de K^+ . Debido a su elevado tamaño, las corrientes de Na^+ aparecen truncadas en los registros. La solución extracelular fue idéntica a la referida en “A”. Solución intracelular (mM): KCl 145, MgCl_2 2, EGTA 3, HEPES 10, ATP. Na_2 2, GTP. Li 0,3; pH ajustado a 7,2 con KOH (~280 mOsm). En los paneles de la derecha se muestran ampliados los registros de corriente comprendidos en los rectángulos dibujados en los correspondientes paneles de la izquierda, que representan la corriente de salida en la etapa final de la segunda fase (-40 mV) del pulso despolarizante. Los resultados mostrados en A y B son representativos de los obtenidos en 3 (Cd^{2+}), 5 (paxilina) y 4 (apamina) células.

4.5.2. Contribución de los canales SK a la actividad eléctrica de las células cromafines en cortes de la glándula adrenal de rata

4.5.2.1. Potencial de membrana en reposo y actividad eléctrica espontánea

En condiciones de reposo (corriente de compensación (I_{comm}) = 0, en la modalidad de fijación de corriente) las células cromafines en cortes de la glándula adrenal presentan un V_r de -55 ± 2 mV ($n = 8$). En estas condiciones, el 90% de las células presenta actividad eléctrica espontánea consistente en la descarga de potenciales de acción a una frecuencia absoluta de $1,3 \pm 0,3$ Hz y una frecuencia instantánea de $2,4 \pm 0,3$ Hz ($n = 11$; 9 ratas).

La superfusión con apamina (200 nM) produjo una ligera despolarización de la membrana ($-51,6 \pm 1,6$ mV; $P < 0,01$, $n = 11$) asociada a la aparición de ráfagas de potenciales de acción con frecuencias instantáneas elevadas ($3,2 \pm 0,4$ Hz; $P = 0,049$, $n = 11$) (**Figura 4.39**). Así mismo, en seis de las once células analizadas se constató también un aumento de la frecuencia absoluta de disparo de los potenciales de acción (incremento desde $1,1 \pm 0,5$ Hz hasta $1,7 \pm 0,5$ Hz; $P = 0,0039$). La despolarización de la membrana en $3,8 \pm 0,9$ mV es atribuible al bloqueo de los canales SK que se encontrarían tónicamente activados por la $[Ca^{2+}]_i$ existente en las células con actividad eléctrica espontánea.

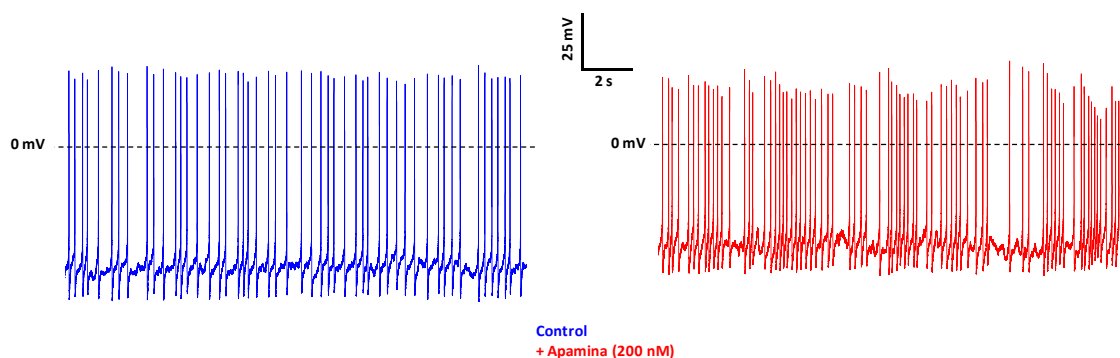


Figura 4.39. Efecto de la apamina sobre la actividad eléctrica espontánea de las células cromafines en cortes de la glándula adrenal de rata. Se muestra un registro de la descarga de potenciales de acción antes (panel izquierdo) y después (panel derecho) de la incubación durante 2 min con apamina (200 nM). El registro es representativo de los obtenidos en 11 células.

El análisis del efecto de la apamina sobre la fisonomía de los potenciales de acción espontáneos se centró en la AHP. El primer parámetro evaluado fue la amplitud de la misma. En condiciones control, la amplitud media de la AHP fue de $13,3 \pm 0,1$ mV ($n = 830$ potenciales de acción, registrados en 11 células), mientras que tras el tratamiento con apamina (200 nM) el valor medio de la amplitud se redujo hasta $11,1 \pm 0,1$ mV ($n = 892$ potenciales de acción; 11 células) (**Figura 4.40A y B**). En las distintas células analizadas la apamina desplaza a la izquierda de forma

paralela la curva de la distribución acumulada de frecuencias de las amplitudes de las AHPs (**Figura 4.40C**). Es de destacar también que el valor mínimo de las AHPs en las células cromafines tras el tratamiento con apamina fue de ~ 10 mV, lo que reflejaría la existencia de un componente de la AHP independiente de los canales SK, y que probablemente sería atribuible a los canales BK (Lingle y col., 1996).

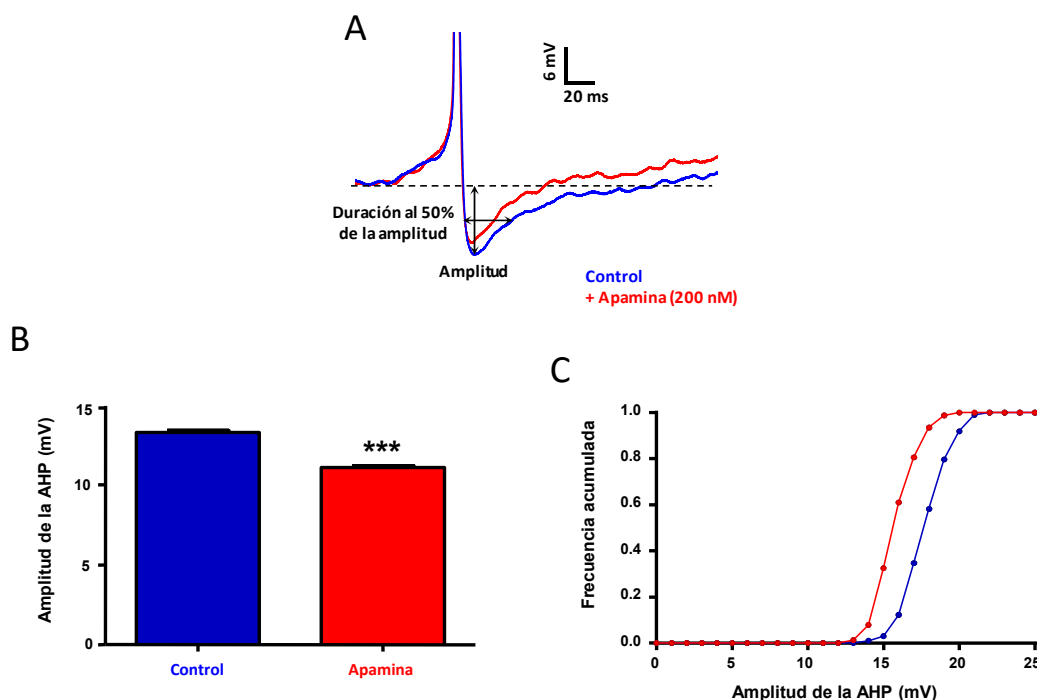


Figura 4.40. Efecto de la apamina sobre la amplitud de la AHP de los potenciales de acción espontáneos de las células cromafines en cortes de la glándula adrenal de rata. **A.** Ejemplos representativos de la AHP de dos potenciales de acción registrados en la misma célula, en ausencia (azul) y presencia (rojo) de apamina (200 nM). Mediante flechas se ilustra la amplitud y la duración al 50% de la amplitud de la AHP; debido a su tamaño el potencial de acción aparece truncado. **B.** Diagrama de barras de la amplitud de la AHP antes y después de la incubación con apamina. Se muestran los resultados del análisis de 830 potenciales de acción en condiciones control y 892 en presencia de apamina, registrados en 11 células, ***, $P < 0,001$. **C.** Distribución acumulada de frecuencias de las amplitudes de la AHP en ausencia (azul) y en presencia de apamina (rojo), en una célula representativa. Se han analizado 98 potenciales de acción y 77 potenciales de acción, antes y después, respectivamente, del tratamiento con apamina.

El segundo parámetro analizado fue la duración de la AHP al 50% de su amplitud máxima. En condiciones control el valor de este parámetro fue de $34,7 \pm 0,4$ ms ($n = 830$ potenciales de acción, 11 células), el cual se redujo en presencia de apamina (200 nM) hasta $27,9 \pm 0,3$ ms ($n = 892$ potenciales de acción; $P < 0,0001$; $n = 11$ células) (**Figura 4.41A**). La realización de gráficas de dispersión de la duración y amplitud de las AHP puso de manifiesto, en cada una de las células analizadas, que la apamina produce una notable reducción de la dispersión de los valores de la duración de la AHP sin modificar de forma notoria la variación de sus amplitudes (**Figura 4.41B**). Por otra parte, el análisis de la gráfica de distribución de frecuencias de la duración de la AHP permitió evidenciar en presencia de apamina un desplazamiento a la izquierda de los valores de la

duración, tanto más importante cuanto más prolongada fuera la AHP (**Figura 4.41C**). Este resultado junto con el derivado de la gráfica de dispersión indica que la actividad de los canales SK es el principal determinante de la duración (componente lento) de la AHP en las células cromafines de la rata.

Ambos efectos de la apamina, reducción de la amplitud y de la duración de la AHP, implican a los canales SK en la génesis de esta fase del potencial de acción y explican su contribución y a la regulación de la frecuencia de disparo de las células cromafines en el seno del tejido adrenomedular. Así mismo, la elevación de la $[Ca^{2+}]_i$, asociada a la actividad eléctrica espontánea, determina la activación tónica de los canales SK posibilitando su participación en el control del Vr.

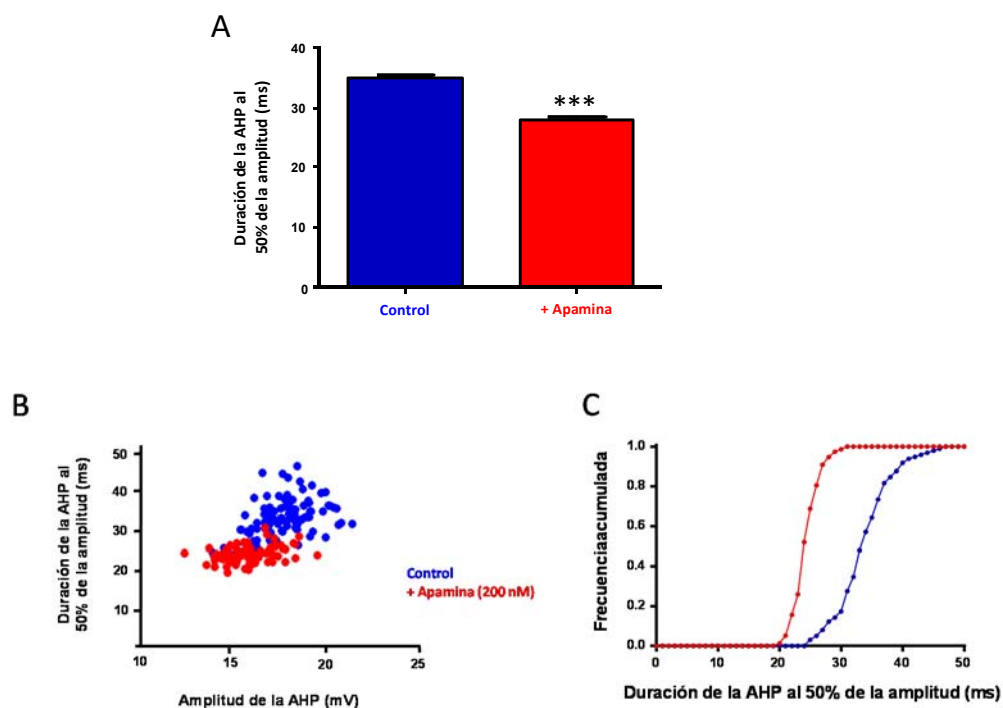


Figura 4.41. Efecto de apamina sobre la duración al 50% de la amplitud máxima de la AHP de los potenciales de acción espontáneos de las células cromafines en cortes de la glándula adrenal de rata. **A.** Diagrama de barras de la duración de la AHP al 50% de la amplitud antes y después de la administración de apamina (200 nM). Se muestran los resultados de 830 potenciales de acción en condiciones control y 892 en presencia de apamina, registrados en 11 células, ***, $P < 0,001$. **B.** Gráfico de dispersión de la duración de la AHP al 50% de la amplitud frente a la amplitud de la AHP de los potenciales de acción de un célula cromafin antes ($n = 98$ potenciales de acción) y después ($n = 77$ potenciales de acción) de la incubación con apamina (200 nM). **C.** Distribución acumulada de frecuencias de la duración al 50% de la amplitud de la AHP de los potenciales de acción en ausencia (azul) y en presencia (rojo) de apamina en la célula analizada en "B". $V_{comm} = -60$ mV.

4.5.2.2. Actividad eléctrica inducida por la inyección de corriente

4.5.2.2.1. Estímulo eléctrico

La inyección de corriente (20 pA, 1 s) en células cromafines en cortes de la glándula adrenal produce la descarga de un tren de potenciales de acción cuya frecuencia instantánea va disminuyendo (fenómeno de adaptación de frecuencia) hasta, eventualmente, interrumpirse la descarga (**Figura**

4.42A y C). Ello es debido a la entrada de Ca^{2+} a través de los canales Ca_v con cada potencial de acción y a su consiguiente acumulación en el citosol, lo que determina la activación creciente de los canales SK y el aumento progresivo del tiempo necesario para que el potencial de membrana alcance el valor umbral para el disparo de los potenciales de acción. El mecanismo involucrado resulta evidente al cesar la inyección de corriente y observar la aparición de una hiperpolarización prolongada de la membrana celular (**Figura 4.42A**). La administración de apamina (200 nM) y la posterior aplicación del pulso de corriente produce trenes de potenciales de acción caracterizados por la despolarización progresiva de la membrana entre potenciales de acción consecutivos y la ausencia de hiperpolarización cuando cesa la inyección de corriente (**Figura 4.42A**). Ello comporta el mantenimiento de la frecuencia instantánea de descarga y la disminución continua de la amplitud de los potenciales de acción a lo largo de la estimulación (**Figura 4.42B y C**). En cambio, en condiciones control la amplitud de los potenciales de acción disminuye durante la primera fase de la estimulación para después estabilizarse o incluso aumentar como consecuencia del fenómeno de adaptación de frecuencia (**Figura 4.42B**). Tanto en estas condiciones como en presencia de apamina, la amplitud de los potenciales de acción vendría determinada por el número de canales Na_v disponibles para ser activados, el cual depende fundamentalmente de su velocidad de recuperación de la inactivación que ocurrirá tanto más lentamente cuanto más despolarizado se encuentre el potencial de membrana entre potenciales de acción consecutivos.

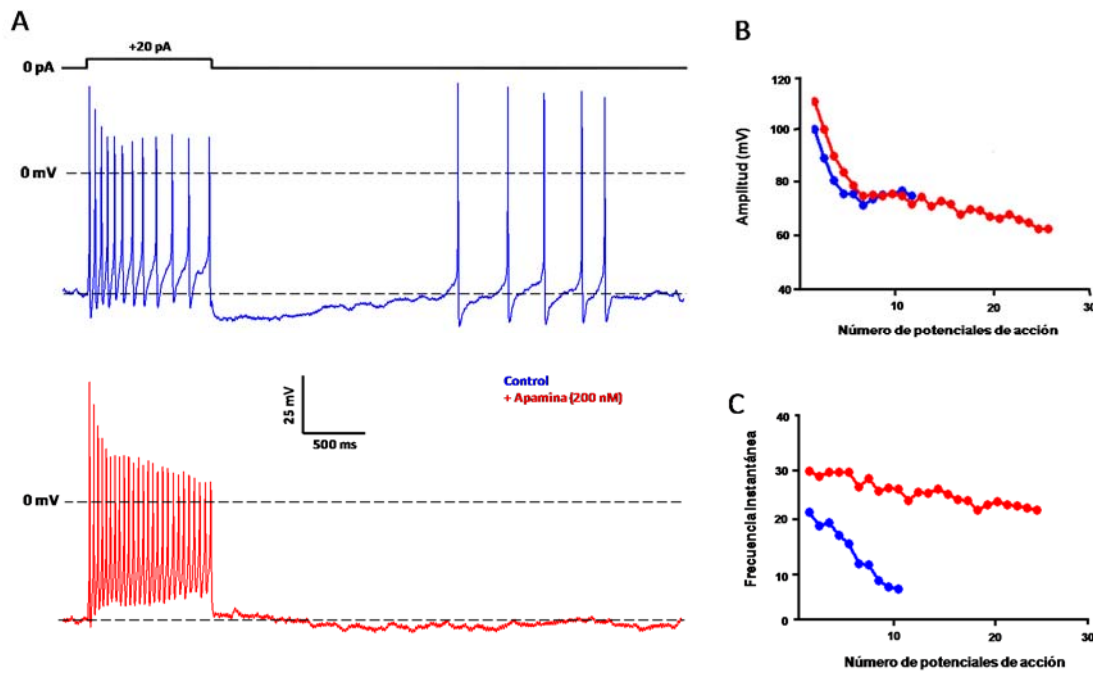


Figura 4.42. Efecto de la apamina sobre el patrón de descarga de potenciales de acción inducidos por la inyección de corriente en células cromafines en cortes de la glándula adrenal de rata. **A.** Trenes de potenciales de acción en respuesta a la inyección de un pulso de 20 pA durante 1 s, antes (Control) y durante la administración de apamina (+ Apamina, 200 nM). Las líneas discontinuas en la parte inferior de los registros denotan el potencial de membrana de la célula instantes antes de aplicar el pulso de corriente. $V_{\text{comm}} = -60$ mV. **B.** Amplitud de los potenciales de acción durante los trenes representados en el panel “A”. **C.** Frecuencia instantánea de descarga de los potenciales de acción durante los trenes representados en el panel “A”. Los resultados mostrados son representativos de los obtenidos en 4 células procedentes de 2 ratas.

4.5.2.2.2. Estímulo farmacológico

Los efectos de la inyección de corriente eléctrica pueden ser simulados mediante la administración de ACh, que activa corrientes iónicas despolarizantes que fluyen a través de los nAChRs. Además, el empleo de este fármaco presenta el atractivo de poder reproducir en buena medida la secuencia de eventos eléctricos que tiene lugar durante la estimulación sináptica de las células cromafines. La administración de un pulso de ACh (50 μ M, 500 ms) indujo la descarga de un tren de potenciales de acción cuya frecuencia y duración se vio modificada por el tratamiento con apamina. Así, en presencia de esta toxina se apreció una respuesta despolarizante más pronunciada y el incremento de la frecuencia de disparo de potenciales de acción con disminución del número y duración de la descarga de los mismos. El primer cambio sería el resultado no solo de la disminución de la AHP que sigue a cada potencial de acción sino también de la capacidad de la ACh en estas condiciones para activar directamente los Ca_v incrementando con ello la entrada de cargas positivas al interior celular. La consecuencia inmediata del aumento de la respuesta despolarizante sería el incremento de la frecuencia de descarga, que, a su vez, favorecería la acumulación de los canales de

Na_v en un estado inactivado con la consiguiente reducción de la amplitud de los potenciales de acción y, en última instancia, el cese del disparo de los mismos durante la administración de ACh (bloqueo por despolarización). Es de destacar que también en la situación control se observa una rápida disminución de la amplitud de los potenciales de acción durante la administración de ACh. Ello sería debido a la marcada despolarización inducida por la ACh, secundaria a la activación de una corriente de varias decenas de pA, como mínimo. Es así mismo reseñable la aparición en condiciones control de un periodo de hiperpolarización de la membrana celular que sigue a la respuesta despolarizante inducida por la ACh (**Figura 4.43**).

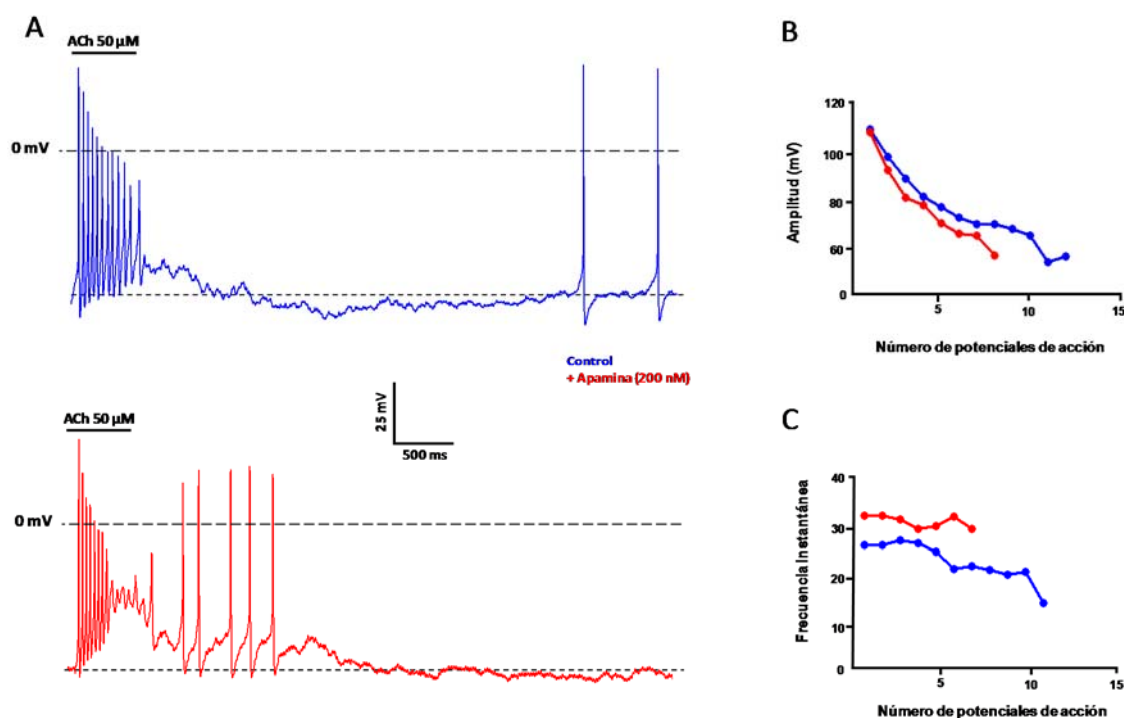


Figura 4.43. Efecto de la apamina sobre el patrón de descarga de potenciales de acción inducidos por la administración de ACh a células cromafines en cortes de la glándula adrenal de rata. **A.** Trenes de potenciales de acción inducidos por la administración de un pulso de ACh (50 μM , 500 ms) antes (Control) y durante de la incubación con apamina (+ Apamina, 200 nM). Las líneas discontinuas de la parte inferior de los registros denotan el potencial de membrana de la célula instantes antes de la administración de ACh. $V_{\text{comm}} = -60 \text{ mV}$. **B.** Amplitud de los potenciales de acción durante los trenes representados en el panel “A”. **C.** Frecuencia instantánea de descarga de potenciales de acción durante los trenes representados en el panel “A”. Los resultados mostrados son representativos de los obtenidos en 4 células procedentes de 2 ratas.

4.5.2.3. Actividad eléctrica inducida por la estimulación del nervio esplácnico

4.5.2.3.1. EPSPs

Los efectos de la administración exógena de ACh difieren de los de la ACh liberada sinápticamente, que están caracterizados por la rapidez de instauración, brevedad y origen local. Es

por ello que decidimos estudiar la posible participación de los canales SK en las respuestas de potencial (EPSPs) y de corriente (EPSCs) inducidas por la ACh liberada en la sinapsis esplanocromafín por la estimulación eléctrica de las terminaciones del nervio esplácnico. Como ya se ha mostrado (**Figura 4.37**), la estimulación eléctrica de baja frecuencia (0,1 Hz) es capaz de inducir EPSPs en aquellas células en las que desencadena corrientes sinápticas sensibles a TTX y d-tubocurarina (EPSCs). Al igual que las EPSCs, los EPSPs presentan una latencia con respecto al artefacto de estimulación, una fase de ascenso rápida y otra de descenso más prolongada, y en función de su amplitud y del estado de los canales Na_v de la membrana celular pueden desencadenar un potencial de acción. Además, la AHP que sigue al potencial de acción puede distorsionar severamente la morfología del EPSP dando lugar a una indentación en el mismo (**Figura 4.44**).

La administración de apamina (200 nM) ocasionó un aumento de la amplitud y duración de los EPSPs, más notorio cuando llevaban asociado un potencial de acción. Ello sería debido a la mayor activación de los canales SK resultante de la entrada de Ca^{2+} a través de canales Ca_v durante el pico y la fase de repolarización del potencial de acción (**Figura 4.44**).

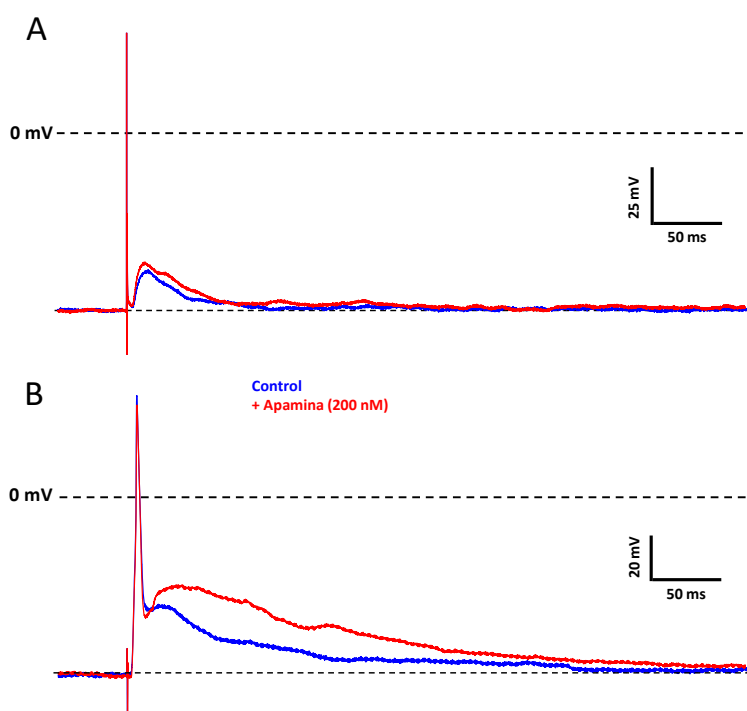


Figura 4.44. Efecto de la apamina sobre los EPSPs inducidos por la estimulación eléctrica (± 50 V; 50 μ s por fase) del nervio esplácnico en células cromafines en cortes de la glándula adrenal de rata. **A.** EPSPs registrados en una célula cromafín antes (Control) y durante el tratamiento con apamina (+Apamina, 200 nM). $V_{\text{comm}} = -80$ mV. **B.** EPSPs asociados a potenciales de acción registrados en una célula cromafín antes (Control) y durante el tratamiento con apamina (+Apamina, 200 nM). $V_{\text{comm}} = -60$ mV. Las líneas discontinuas de la parte inferior de los registros denotan el potencial de membrana de la célula instantes antes de estimular eléctricamente las terminaciones del nervio esplácnico. Los resultados mostrados son representativos de los obtenidos en 3 células procedentes de 2 ratas.

4.5.2.3.2. EPSCs

Al objeto de verificar la existencia de un acoplamiento funcional directo que excluya la participación de los canales Ca_v entre los nAChRs sinápticos y los canales SK (capacidad de los iones Ca^{2+} que permean los nAChRs para activar los canales SK) decidimos evaluar el efecto de la apamina sobre las EPSCs inducidas por la estimulación eléctrica de las terminaciones del nervio esplácnico. La estimulación a baja frecuencia (0,1 Hz) ocasiona EPSCs de amplitud reproducible (**Figura 4.36**) y con periodos de latencia habitualmente constantes en cada célula cromafín. En condiciones control y a un V_h de -60 mV, la fase de caída de las EPSCs sigue una cinética monoexponencial con una constante de tiempo (τ_{control}) de $9,9 \pm 1,7$ ms ($n = 4$ células, 4 ratas). La administración de apamina (200 nM) se asoció al enlentecimiento de la cinética de las EPSCs (τ_{apamina} de $13,1 \pm 2,2$ ms; $P = 0,01$), lo que se tradujo en la aparición de un componente “tardío” de la EPSC (medido a $3\tau_{\text{Control}}$ desde el pico) con una amplitud de ~ 18 pA (**Figura 4.45A y C**).

Una prueba adicional de la participación de los canales SK en la fisonomía de las EPSCs vino dada por la desaparición del efecto de la apamina al llevar el V_h a -90 mV, un valor próximo al potencial de equilibrio del K^+ (E_K) en nuestras condiciones experimentales. La hiperpolarización de la membrana celular produjo un pequeño enlentecimiento ($\tau = 14 \pm 2$ ms; $P = 0,03$ con respecto al V_h de -60 mV, $n = 4$ células) de la fase de caída de las EPSCs en condiciones control, compatible con una desactivación más lenta de los nAChRs (Barbara y Takeda, 1996). En presencia de apamina no se constató cambio significativo alguno en la fase de caída, que conservó su velocidad ($\tau = 12,5 \pm 2,2$ ms; $n = 4$ células) y el carácter monoexponencial de su cinética (**Figura 4.45B y C**). Debe señalarse también que la apamina no incrementó la amplitud máxima de las EPSCs tanto cuando se registraron al V_h de -60 mV (285 ± 83 pA frente a 282 ± 84 pA; $P = 0,9$) como al de -90 mV (586 ± 95 pA frente a 533 ± 100 pA; $P = 0,7$). Estos resultados son consistentes con la ausencia de efecto de la apamina sobre el pico de la corriente inducida por la administración de ACh en células cromafines aisladas de la médula adrenal de rata (Olivos-Oré, 2009).

A la vista de estos resultados, es posible concluir que la apamina no interfiere con la activación de los nAChRs y que los canales SK modulan la fase de caída de las EPSCs al ser activados por los iones Ca^{2+} que acceden al interior celular a través de los nAChRs presentes en la membrana sináptica de la célula cromafín de la rata.

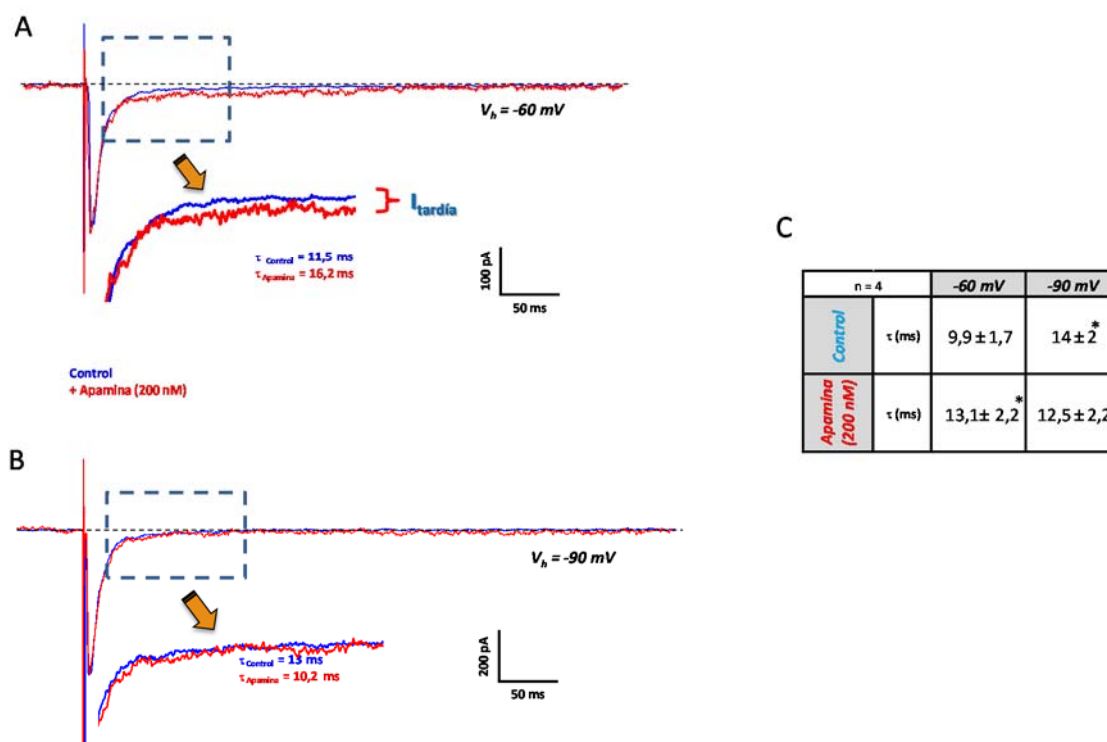


Figura 4.45. Efecto de la apamina sobre las EPSCs inducidas por la estimulación eléctrica del nervio esplácnico (± 50 V; $50 \mu\text{s}$ por fase) en células cromafines en cortes de la glándula adrenal de rata. **A.** EPSCs registradas en una célula cromafin antes (Control) y durante el tratamiento con apamina (+ Apamina, 200 nM) al V_h de -60 mV . **B.** EPSCs registradas en la misma célula cromafin antes (Control) y durante el tratamiento con apamina (+ Apamina, 200 nM) al V_h de -90 mV . Se indican los valores de las constantes de tiempo (τ) derivadas del ajuste de una función monoexponencial a la fase de caída de las EPSCs. En escala expandida se muestra además el registro del componente tardío de las EPSCs ($I_{\text{tardía}}$). Las líneas negras discontinuas de los registros denotan la corriente a través de la membrana celular instantes antes de la estimulación eléctrica. **C.** Tabla resumen del análisis cinético realizado en células cromafines sometidas los protocolos experimentales representados en "A" y "B". *, $P < 0,05$ con respecto a la condición control, en ausencia de apamina al V_h de -60 mV .

4.5.3. Efecto de la α -conotoxina RgIA sobre la actividad eléctrica de las células cromafines en cortes de glándula adrenal de rata

4.5.3.1. Descarga de potenciales de acción inducida por la administración de ACh exógena

Una vez estudiada la participación de los canales SK en las respuestas de voltaje o corriente dependientes de la activación de nAChRs por la administración de ACh exógena o por la liberada por las terminaciones del nervio esplácnico, procedimos a estudiar la contribución de los nAChRs $\alpha 9^*$ y $\alpha 10^*$ en el acoplamiento funcional entre los nAChRs y los canales SK. Ello requería en primer lugar evaluar los efectos de la α -RgIA sobre diversas conductancias iónicas de la membrana celular, como las de Na^+ y K^+ dependientes de voltaje y/o de Ca^{2+} , incluyendo la propia SK, que pudieran modificar la actividad de los canales SK independientemente de su efecto sobre los nAChRs. La **figura 4.46** muestra los efectos de α -RgIA (200 nM) sobre las corrientes activadas por un pulso despolarizante bifásico ($+10 \text{ mV}$ durante 100 ms , -40 mV durante 400 ms). La administración de α -RgIA no modificó la amplitud de las corrientes de entrada (amplitudes máximas de $2,48 \pm 0,36 \text{ nA}$

y $2,46 \pm 0,38$ nA, antes y durante, respectivamente, de la administración de la toxina; $P = 0,96$; $n = 6$ células, 6 ratas), la integral de la corriente de salida durante la primera fase del pulso despolarizante (160 ± 17 pC y 151 ± 14 pC, respectivamente, en ausencia y en presencia de α -RgIA; $P = 0,6$) o la amplitud de la corriente de salida durante los últimos instantes de la segunda fase del pulso despolarizante (30 ± 1 pA y 28 ± 3 pA, respectivamente, en ausencia y en presencia de α -RgIA; $P = 0,61$; $n = 6$ células, 6 ratas). Estos resultados indican que la α -RgIA no modifica el flujo de iones a través de los canales Na_v , K_v , BK y SK. Además, son consistentes con la ausencia de efecto de esta toxina sobre los canales Ca_v de las neuronas DRG (**Figura 4.14**) y de las células cromafines aisladas de la médula adrenal de la rata (**Figura 4.10**). Nuestra siguiente aproximación fue la de evaluar el efecto de la α -RgIA sobre los cambios en el potencial de membrana inducidos por la administración de ACh exógena. La concentración ($50 \mu M$) y tiempo de administración (250 ms) escogidos aspiraban a producir respuestas despolarizantes de amplitud y duración similares a las de los EPSPs inducidos por la estimulación eléctrica de campo. En condiciones control se obtuvieron resultados similares a los de la **figura 4.43**, si bien la menor duración del pulso de ACh produjo un tren de potenciales de acción más corto así como una hiperpolarización de menor duración una vez finalizada la administración del fármaco (**Figura 4.47A**). Esta circunstancia no fue impedimento para que se observara el fenómeno de adaptación de la frecuencia de disparo durante el tren de potenciales de acción y, en consecuencia, pudiera incrementarse la amplitud de los potenciales de acción al favorecerse la recuperación de la inactivación de los canales Na_v por una mayor duración de los intervalos entre potenciales de acción consecutivos. La administración de α -RgIA (200 nM) redujo la amplitud de la despolarización inducida por ACh al tiempo que aumentó la frecuencia instantánea de descarga de los potenciales de acción. Este efecto se acompañó de una disminución continua de la amplitud de los potenciales de acción y de la desaparición del fenómeno de adaptación de la frecuencia de disparo. Además, la α -RgIA abolió la fase de hiperpolarización posterior al tren de potenciales de acción (**Figura 4.47B**). Los efectos de la α -RgIA sobre la descarga de potenciales de acción mimetizan los efectos de la apamina, lo que sugiere que además de despolarizar la membrana celular, los nAChRs $\alpha 9^*$ y/o $\alpha 10^*$ podrían, indirectamente, mediante la activación de los canales SK, modificar en dirección opuesta el potencial de membrana.

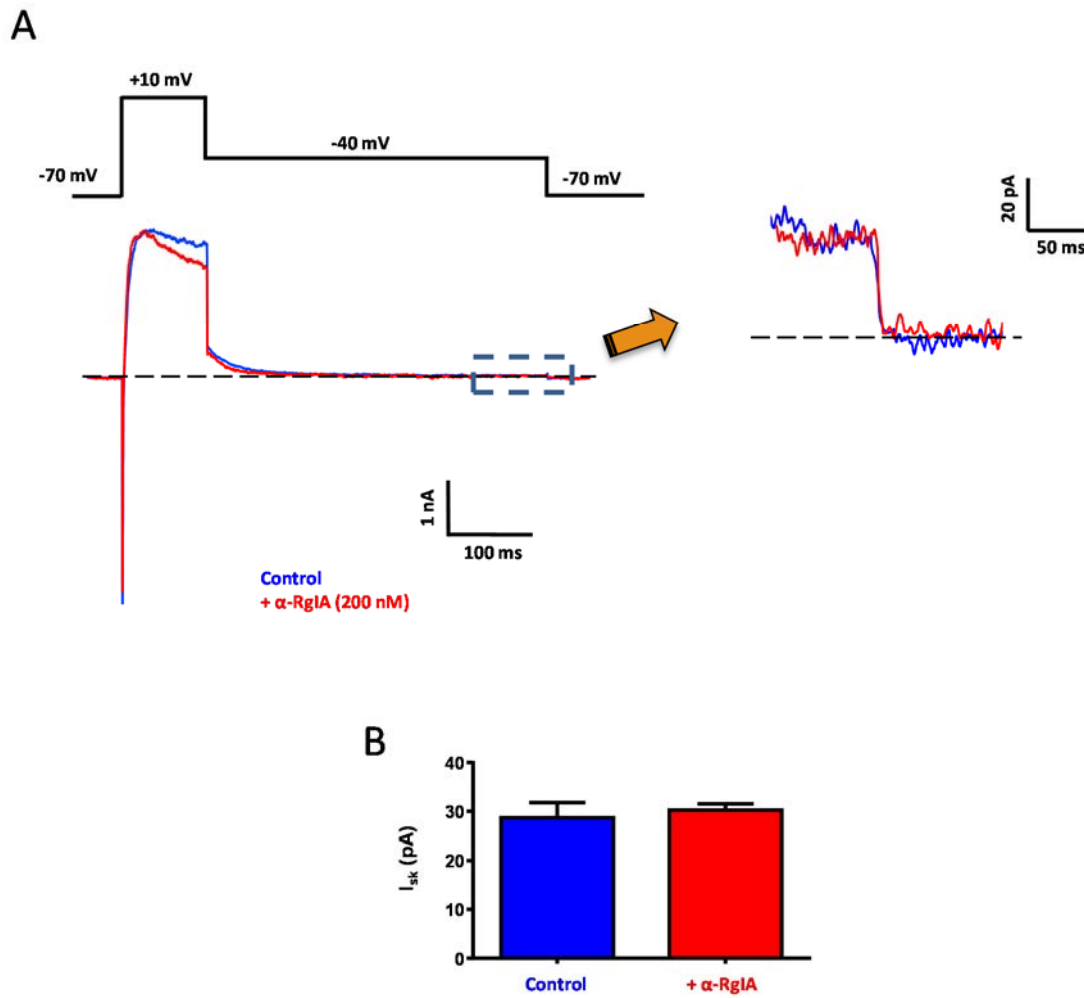


Figura 4.46. Efecto de la α -RgIA sobre las corrientes de Na^+ y de K^+ activadas por la despolarización de la membrana de las células cromafines en cortes de la glándula adrenal de la rata. **A.** Registro representativo del efecto de la α -RgIA (200 nM) sobre las corrientes iónicas activadas por un pulso despolarizante bifásico (véase el protocolo de voltaje). Solución extracelular (mM): NaCl 145, KCl 2,8, CaCl_2 2, MgCl_2 2, HEPES 10, glucosa 10; pH ajustado a 7,2 con HCl o NaOH (~300 mOsm); solución intracelular (mM): KCl 145, MgCl_2 2, EGTA 3, HEPES 10, ATP. Na_2 2, GTP.Li 0,3; pH ajustado a 7,2 con KOH (~280 mOsm). En el panel de la derecha se muestran ampliados los registros de corriente comprendidos en el rectángulo dibujado en el panel de la izquierda, que corresponden a la etapa final de la segunda fase (-40 mV) del pulso despolarizante. **B.** Diagrama de barras representativo del efecto de α -RgIA (200 nM; + α -RgIA) sobre la amplitud de la corriente SK medida al final de la segunda fase del pulso despolarizante despolarización ($n = 6$; 6 ratas).

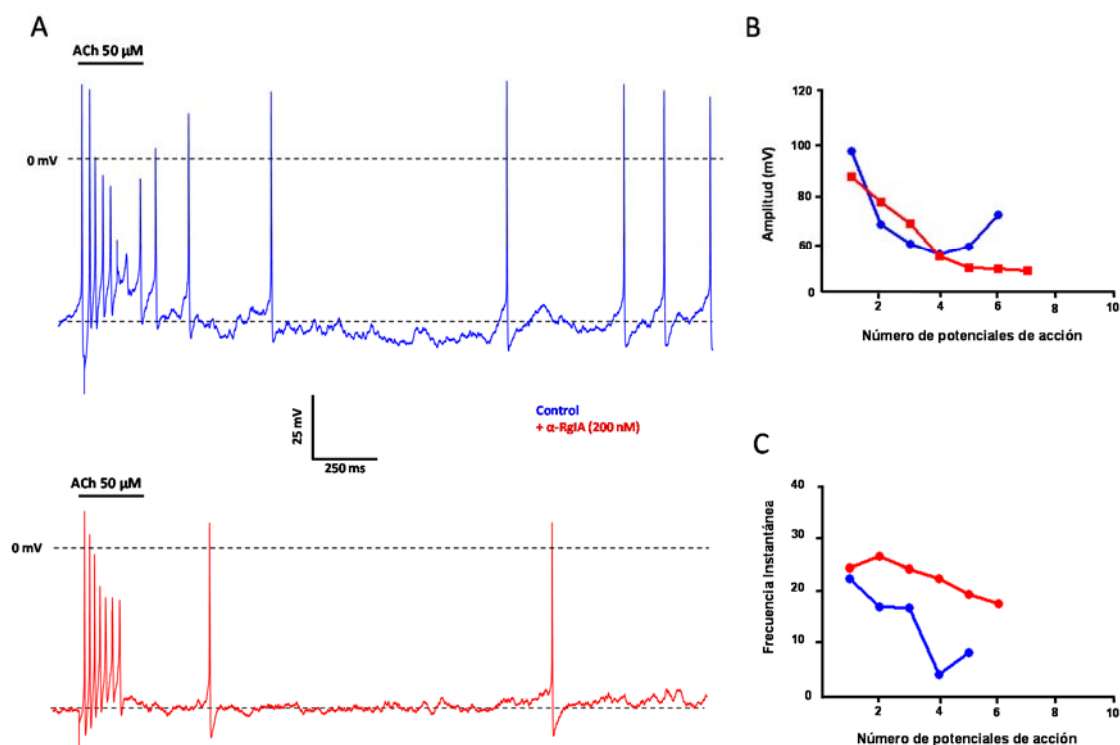


Figura 4.47. Efecto de la α -RgIA sobre el patrón de descarga de potenciales de acción inducido por la administración de ACh a una célula cromafín en un corte de la glándula adrenal de rata. **A.** Trenes de potenciales de acción inducidos por la administración de un pulso de ACh (50 μ M, 250 ms), antes (Control) y durante la incubación con α -RgIA (+ α -RgIA, 200 nM). Las líneas discontinuas de la parte inferior de los registros denotan el potencial de membrana de la célula instantes antes de administrar la ACh. V_{comm} = -60 mV. **B.** Amplitud de los potenciales de acción durante los trenes representados en el panel "A". **C.** Frecuencia instantánea de descarga de los potenciales de acción durante los trenes representados en el panel "A". Los resultados son representativos de los obtenidos en 3 células.

4.5.3.2. Actividad eléctrica inducida por la estimulación del nervio esplácnico

En este apartado consignamos los resultados obtenidos en relación al efecto de la α -RgIA sobre las respuestas de corriente (EPSCs) y de potencial (EPSP) inducidas por la estimulación eléctrica en cortes de la glándula adrenal. El objetivo de estos experimentos fue el de confirmar la ubicación sináptica de los nAChRs $\alpha 9^*$ y/o $\alpha 10^*$ y estudiar su posible colocalización con los canales SK. La administración de α -RgIA (200 nM) disminuyó la amplitud de las EPSCs, en consonancia con la localización presináptica y postsináptica de los nAChRs $\alpha 9^*$ y/o $\alpha 10^*$ (**Figura 4.48**). El porcentaje de inhibición de la corriente fue similar cuando el V_h fue de -60 mV ($28,1 \pm 0,1\%$, P = 0,0041; disminución de la corriente desde 196 ± 18 pA en condiciones control hasta 138 ± 11 pA en presencia de α -RgIA; n = 4 células, 4 ratas) o de -90 mV ($32 \pm 0,1\%$, P = 0,0038; disminución de la

corriente desde 436 ± 76 pA en condiciones control hasta 188 ± 51 pA en presencia de α -RgIA; $n = 4$ células, 4 ratas). La ausencia de dependencia de voltaje de los efectos de α -RgIA sugiere que se une a los nAChRs en el dominio extracelular, fuera del campo eléctrico de la membrana plasmática (Ellison y col., 2008).

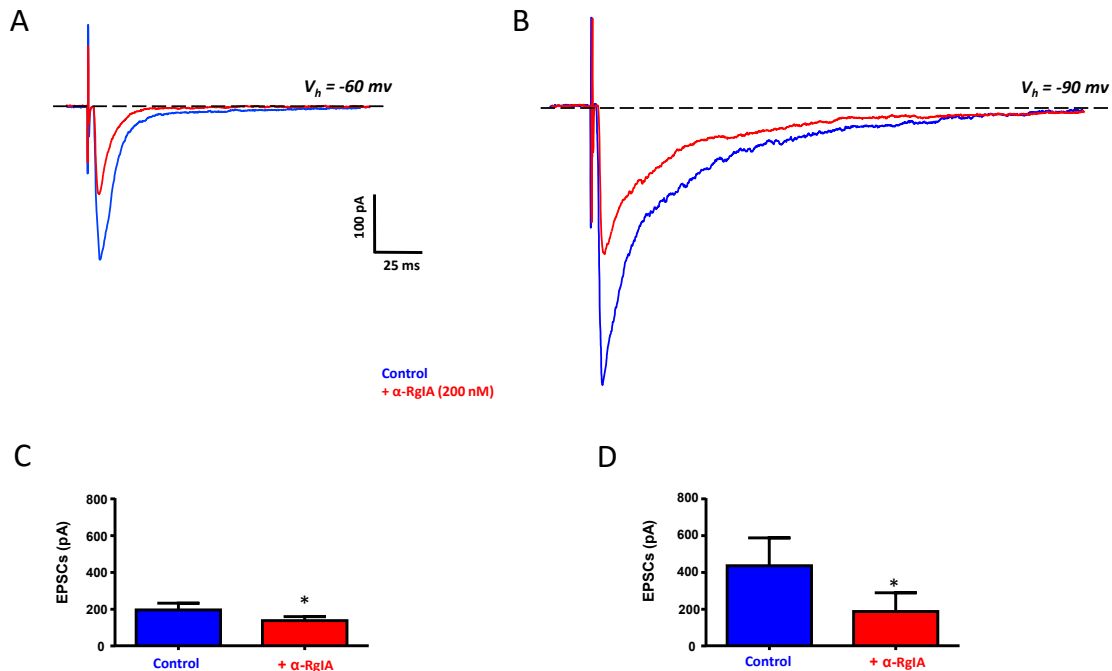


Figura 4.48. Efecto de la α -RgIA sobre las EPSCs de las células cromafines inducidas por la estimulación eléctrica del nervio esplácnico (± 50 V; 50 μ s por fase) en cortes de la glándula adrenal de la rata. **A.** EPSCs registradas en una célula cromafín antes (Control) y durante el tratamiento con α -RgIA (200 nM; + α -RgIA) al V_h de -60 mV. **B.** EPSCs registradas en una célula cromafín antes (Control) y durante el tratamiento con α -RgIA (200 nM; + α -RgIA) al V_h de -90 mV. **C.** Diagrama de barras representativo de la amplitud de las EPSCs antes (Control) y durante el tratamiento con α -RgIA (200 nM; + α -RgIA) al V_h de -60 mV ($n = 4$). **D.** Diagrama de barras representativo de la amplitud de las EPSCs antes (Control) y durante el tratamiento con α -RgIA (200 nM; + α -RgIA) al V_h de -90 mV ($n = 4$). *, $P < 0,05$ con respecto al control.

Teniendo en cuenta que la entrada de Ca^{2+} a través de nAChRs es proporcional a la amplitud de las EPSCs, lo cual podría influir en la cinética de las mismas —vía activación de los canales SK— con independencia de los tipos de nAChRs implicados en su génesis, para el análisis cinético utilizamos EPSCs con amplitudes similares en presencia de α -RgIA y en condiciones control. Ello fue posible gracias a las fluctuaciones que se observan en las amplitudes de las EPSCs cuando se aplican estímulos eléctricos de baja frecuencia (0,1 Hz) (Figura 4.36).

La administración de α -RgIA (200 nM) enlenteció la fase de caída de las EPSCs registradas al V_h de -60 mV, de forma que la τ del proceso pasó de ser de $6,1 \pm 1$ ms en condiciones control a $6,7 \pm 1$ ms en presencia de la toxina ($P = 0,002$; $n = 4$ células, 4 ratas) (Figura 4.49A). Es de destacar que efectos compatibles con los ejercidos por la α -RgIA en las EPSCs se obtuvieron también sobre

las EPSPs, consistentes en un aumento del área de las mismas relacionado con el enlentecimiento de la fase de repolarización (**Figura 4.49B**).

Al igual que se observó en los experimentos en los que se empleó apamina, en presencia de α -RgIA no se constataron cambios en la cinética de las EPSCs cuando el V_h fue de -90 mV (τ de 17 ± 7 ms y de 16 ± 6 ms, antes y durante la administración de α -RgIA, respectivamente; $P = 0,32$; $n = 4$) (**Figura 4.49C**). La dependencia de voltaje del efecto de la α -RgIA apunta a los canales SK como efectores de la acción de la toxina, que en primera instancia estaría mediada por la inhibición de la entrada de Ca^{2+} a través de los nAChRs $\alpha 9^*$ y/o $\alpha 10^*$.

Esta hipótesis se vio corroborada por los resultados de experimentos en los que se evaluó el efecto de α -RgIA en células previamente tratadas con apamina. Si en los efectos de la primera participan los canales SK, el bloqueo de los mismos con apamina debería abrogar los efectos del antagonista nicotínico sobre la cinética de las EPSCs. En este caso las glándulas adrenales se obtuvieron de animales sometidos al protocolo de estrés por frío. Al igual que se observó en las células de animales control, la administración de apamina (200 nM) mediante perfusión en el baño indujo un enlentecimiento de la fase de caída de las EPSCs ($\tau_{control} = 7,8 \pm 0,3$ ms, $\tau_{apamina} = 12,8 \pm 2,5$ ms; $P = 0,04$, 3 células) sin modificación en la amplitud máxima de la corriente (314 ± 41 pA y 338 ± 58 pA, en ausencia y en presencia, respectivamente, de apamina). La posterior coadministración de apamina y α -RgIA (200 nM) desde una pipeta de vidrio situada en la vecindad de la célula en estudio no indujo modificación adicional alguna en la cinética de las EPSCs (τ de $11,3 \pm 1,8$ ms; $P = 0,05$) a pesar de producir una disminución del $51 \pm 7\%$ ($P = 0,0005$) de la amplitud máxima de las mismas (144 ± 22 pA) (**Figura 4.50**).

La similitud de los resultados obtenidos mediante el empleo de bloqueantes de los canales SK y de los nAChRs $\alpha 9^*$ y $\alpha 10^*$ sobre la cinética de las EPSCs, y la oclusión del efecto de los bloqueantes de estos últimos tras la inhibición de los canales SK, sugiere un acoplamiento entre la activación de los nAChRs $\alpha 9^*$ y $\alpha 10^*$ y los canales SK en las células cromafines de la médula adrenal de la rata. Adicionalmente, el incremento del efecto inhibitor de la α -RgIA sobre la amplitud de las EPSCs registradas en las células de los animales estresados respecto al observado en animales control es consistente con el incremento de la expresión de nAChRs $\alpha 9^*$ y/o $\alpha 10^*$ sinápticos en la médula adrenal en condiciones de estrés crónico.

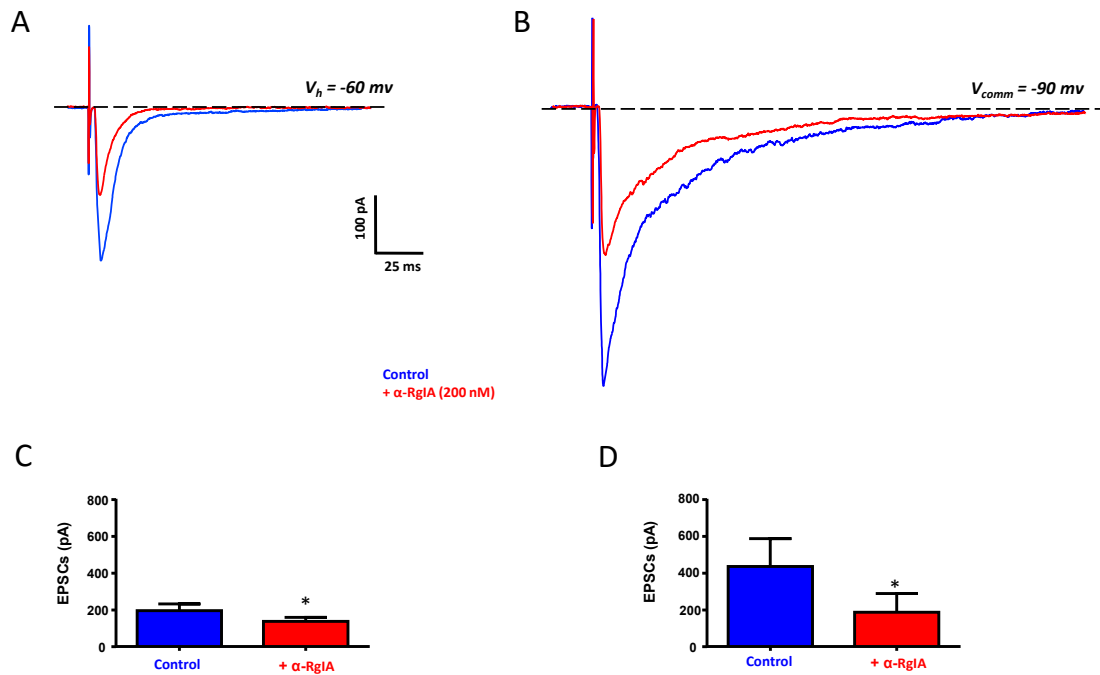


Figura 4.49. Efecto de la α -RgIA sobre las EPSCs y los EPSPs inducidos por la estimulación eléctrica del nervio esplácnico (± 50 V; 50 μ s por fase) en células cromafines en cortes de la glándula adrenal de rata. **A.** EPSCs registradas en una célula cromafín antes (Control) y durante la administración de α -RgIA (+ α -RgIA, 200 nM) al V_h de -60 mV. **B.** EPSPs registrados en una célula cromafín antes (Control) y durante la administración de α -RgIA (+ α -RgIA, 200 nM). Se observa un potencial de acción superpuesto a cada EPSP y el aumento de la duración de éste tras la administración de la toxina. $V_{comm} = -60$ mV. **C.** EPSCs registradas en una célula cromafín (Control) y durante la administración de α -RgIA (+ α -RgIA, 200 nM) al V_h de -90 mV. Las líneas discontinuas horizontales denotan el nivel de corriente ("A" y "C") o del potencial de membrana ("B") instantes antes de la aplicación del estímulo eléctrico. En "A" y "C" se indican las τ derivadas del ajuste de una función monoexponencial a la fase de caída de las EPSCs. **D.** Tabla resumen del análisis cinético de las EPSCs registradas en 4 células. **, $P < 0,01$ con respecto al control.

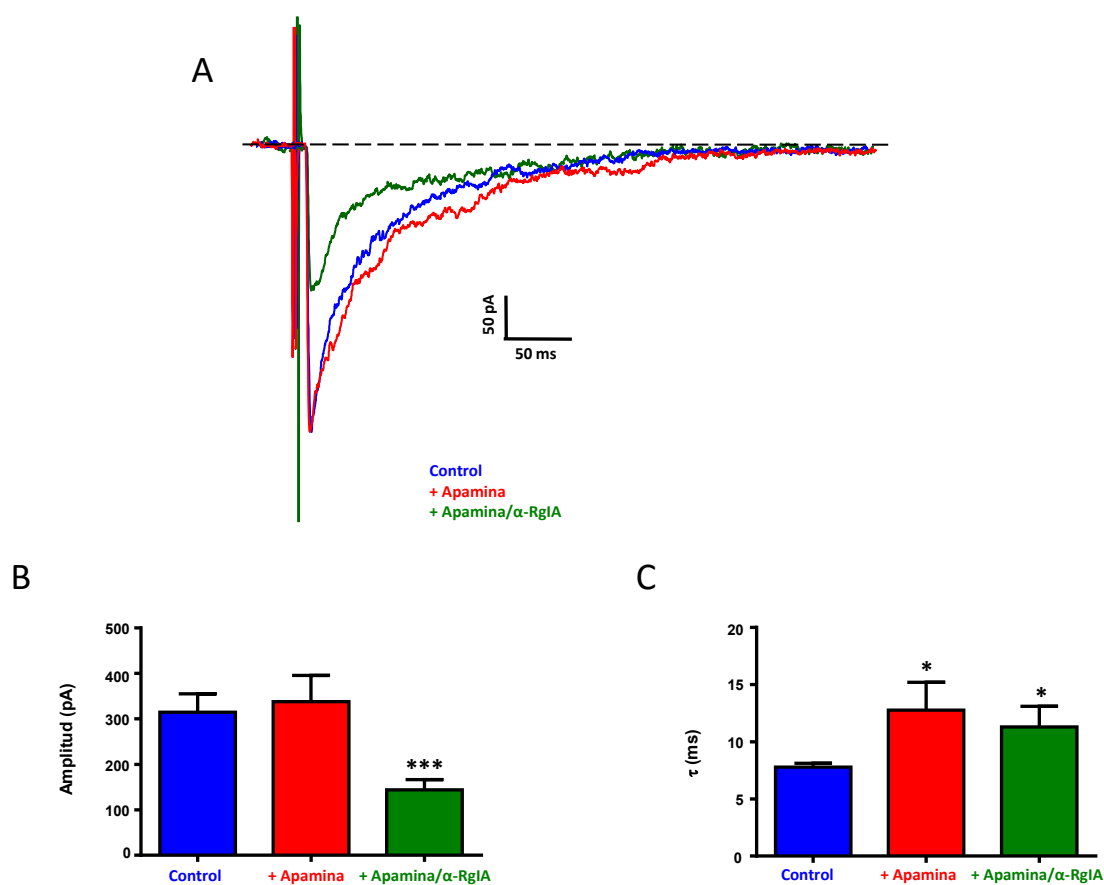


Figura 4.50. Efecto de la administración consecutiva de apamina y α -RgIA sobre las EPSCs inducidas eléctricamente en células en cortes de la glándula adrenal de animales sometidos a un protocolo de estrés por frío. **A.** Registro de EPSCs en ausencia (Control), en presencia de apamina (200 nM; + Apamina) y durante la posterior administración conjunta de α -RgIA (200 nM) y apamina (+ Apamina/ α -RgIA). $V_h = -60$ mV **B.** Diagrama de barras del efecto de apamina (+ Apamina) y de la combinación de apamina y α -RgIA (+ Apamina/ α -RgIA) sobre la amplitud de las EPSCs ($n = 3$ células).). ***, $P < 0,001$ con respecto a la condición con apamina. **C.** Diagrama de barras del efecto de apamina (+ Apamina) y de la combinación de apamina y α -RgIA (+ Apamina/ α -RgIA) sobre la τ de las EPSCs ($n = 3$ células). *, $P < 0,05$ con respecto a la condición control.

V. DISCUSIÓN

El presente trabajo se encuadra en una línea de investigación sobre la “Farmacología de los nAChRs” que, en última instancia, aspira al desarrollo de fármacos selectivos para los distintos tipos de nAChRs y potencialmente útiles para el tratamiento de diversas entidades nosológicas (enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esquizofrenia, dolor, adicción tabáquica, cáncer de pulmón, etc.) con prevalencia creciente en las sociedades desarrolladas. Más concretamente, nuestro trabajo se suma al de otros laboratorios interesados en la caracterización molecular, farmacológica, biofísica e indagación del significado funcional de los nAChRs presentes en las células cromafines de la médula adrenal de los mamíferos. Las células cromafines constituyen un modelo ampliamente utilizado desde hace más de 40 años para el estudio de la farmacología colinérgica y de la neurosecreción (Douglas y Rubin, 1961b; Douglas y Rubin, 1961a; Douglas, 1968). Es de destacar que las primeras indagaciones sobre la naturaleza ganglionar de los receptores nicotínicos de las células cromafines datan de los años 70 del siglo pasado (Brandt y col., 1976), y que el empleo de la α -Bgtx en este modelo celular se remonta al comienzo de la década de los 80 (Kilpatrick y col., 1981). Debe recordarse también que los primeros registros electrofisiológicos de corrientes unitarias a través de los nAChRs neuronales se llevaron a cabo en las células cromafines (Fenwick y col., 1982). En la actualidad, las células cromafines siguen constituyendo un buen modelo para el estudio de los nAChRs neuronales, dada la diversidad de los que expresan (Criado y col., 1997; Mousavi y col., 2001; Di Angelantonio y col., 2003; Sala y col., 2008), y para la investigación de su relevancia fisiológica e implicaciones fisiopatológicas a tenor de las ventajas que ofrecen para el estudio de la respuesta neurosecretora (Neher y Marty, 1982; López y col., 1998; Rettig y Neher, 2002; Artalejo, 2005). El objetivo fundamental de este trabajo ha sido la caracterización farmacológica de los nAChRs de las células cromafines de la médula adrenal de la rata y el estudio de sus modificaciones en un modelo experimental de estrés crónico por frío. La consecución de este objetivo ha requerido, con carácter previo, la validación de la selectividad farmacológica de la α -RgIA para bloquear las corrientes a través de los nAChRs $\alpha 9^*$ y $\alpha 10^*$, lo que posteriormente ha posibilitado la identificación de nuevos nAChRs heteroméricos en las células cromafines. Algunos de estos nAChRs desempeñarían un importante papel en la regulación de la transmisión sináptica en la unión esplacno-cromafín y, consiguientemente, de la función secretora las células cromafines en condiciones de estrés.

5. 1. ANÁLISIS DE LA SELECTIVIDAD FARMACOLÓGICA DE LA α -RgIA

El primero de los objetivos del trabajo implicó la realización de un análisis exhaustivo de la selectividad farmacológica de la α -RgIA. Dicho análisis resultaba pertinente de cara a su empleo en la caracterización de los nAChRs de las células cromafines de rata así como para la correcta interpretación de los resultados de experimentos en los que esa toxina se utilizase para modular la

actividad eléctrica de dichas células o la liberación –espontánea o inducida eléctricamente– de ACh por las terminaciones de las fibras del nervio esplácnico en cortes de tejido adrenoglandular. El estudio resultaba además necesario a tenor de la ausencia de datos sobre la selectividad de esta toxina sobre nAChRs nativos en sistemas que expresan múltiples tipos de nAChRs y porque se ha propuesto que la α -RgIA puede comportarse como agonista de los receptores GABA_B.

Hasta la realización de este trabajo, las evidencias disponible sobre la selectividad de la α -RgIA procedían de los estudios del grupo de Michael J. McIntosh (Universidad de Utah) llevados a cabo en ovocitos de *Xenopus laevis* en los que se expresaban nAChRs $\alpha 9\alpha 10$ así como diferentes combinaciones de subunidades formadoras de los principales nAChRs neuronales. Los resultados obtenidos indicaban que la α -RgIA inhibía las corrientes a través de los nAChRs $\alpha 9\alpha 10$ de la rata con una CI_{50} (5,2 nM) al menos tres órdenes de magnitud menor que la necesaria para inhibir a los demás nAChRs (Ellison y col., 2006; McIntosh y col., 2009). Aunque la bondad de estos resultados fue confirmada en las células ciliadas internas del epitelio sensorial de la cóclea, que expresan fundamentalmente nAChRs $\alpha 9\alpha 10$, debe señalarse que Escalona (Escalona y col., 2006), utilizando también los ovocitos de *Xenopus laevis* como sistema de expresión, observaron que la α -RgIA podía inhibir las corrientes a través de nAChRs $\alpha 3\beta 4$ y $\alpha 7$ bovinos. Si bien dichos experimentos no cuestionaban la capacidad de la α -RgIA para unirse a los nAChRs $\alpha 9^*$ y $\alpha 10^*$, planteaban la posibilidad de que interactuase también a otros nAChRs.

Nuestra estrategia para abordar el problema de la selectividad de la α -RgIA ha sido diferente a las previamente mencionadas. Así, hemos recurrido al uso de: i) células cromafines de ratones $\alpha 9$ KO al objeto de verificar la ausencia de efecto de α -RgIA sobre otros tipos de nAChRs; ii) neuronas DRG de rata, que expresan las subunidades $\alpha 7$ y $\alpha 10$, a fin de confirmar la capacidad de la α -RgIA para inhibir las corrientes a través de nAChRs $\alpha 10^*$ y, al tiempo, investigar su posible acción agonista de los receptores GABA_B; iii) agonistas (PNU282987) y moduladores (PNU120596) selectivos de los nAChRs $\alpha 7$ para descartar un posible efecto de la α -RgIA sobre los nAChRs $\alpha 7$ homoméricos; y iv) células cromafines de rata, en las que investigamos el efecto de la α -RgIA sobre las principales conductancias iónicas dependientes de voltaje de la membrana celular.

Debe señalarse que la expresión de las subunidades $\alpha 7$, $\alpha 9$ y $\alpha 10$ en las células cromafines de la rata ha sido confirmada mediante la amplificación de sus ARNm de células individuales en cultivo (Solís-Garrido, 2006; Olivos-Oré, 2009) y de la glándula adrenal (Colomer y col., 2010), así como mediante estudios inmunohistoquímicos (Solís-Garrido, 2006) e inmunocitoquímicos (Solís-Garrido, 2006; Olivos-Oré, 2009). Los mismos anticuerpos empleados en esos estudios fueron utilizados en la caracterización inmunocitoquímica de las células cromafines de los ratones $\alpha 9$ KO y de sus controles, lo que nos permitió comprobar la ausencia de inmunorreactividad de la subunidad $\alpha 9$ en los primeros, así como la presencia de la correspondiente a la subunidad $\alpha 7$ en animales de ambas cepas. Finalmente, y en consonancia con los datos publicados en la literatura (Lips y col.,

2002; Haberberger y col., 2004; Callaghan y Adams, 2010; Hone y col., 2012), las neuronas DRG de la rata mostraron inmunorreactividad para las subunidades $\alpha 7$ y $\alpha 10$. Merece la pena, en este punto, mencionar que los distintos anticuerpos primarios utilizados fueron específicos (se unen a proteínas con pesos moleculares coincidentes con los de las subunidades $\alpha 7$, $\alpha 9$ y $\alpha 10$ en lisados de la médula adrenal de rata y que la ausencia de ARNm codificante para una subunidad determinada se asociaba a la ausencia de marcaje con el anticuerpo correspondiente) (Solís-Garrido, 2006), si bien los marcajes no siempre se limitaban a la membrana celular. Ello podría ser debido tanto a la presencia de nAChRs en endomembranas implicadas en el tráfico intracelular de proteínas como a la ubicación de los mismos en las mitocondrias, donde se encargarían de regular la apoptosis (Chernyavsky y col., 2015a; Chernyavsky y col., 2015b).

Nuestros resultados son consistentes con la selectividad de la α -RgIA para inhibir las corrientes a través de los nAChRs $\alpha 9^*$ y/o $\alpha 10^*$. En este sentido es destacar la ausencia de efecto de la toxina sobre las corrientes inducidas por ACh (también sobre las inducidas por Cho y Oxo-M) en las células cromafines de los ratones $\alpha 9$ KO, a diferencia de lo que se observa en los animales control. Así mismo, la α -RgIA inhibió la corriente inducida por ACh en neuronas DRG de rata, que expresan la subunidad $\alpha 10$ pero no la $\alpha 9$. Por otra parte, a diferencia de la α -Bgtx, la α -RgIA no modificó las corrientes mediadas por nAChRs $\alpha 7$ homoméricos activados por la combinación de PNU282987 y PNU120596. Carecemos de una explicación para el efecto de la α -RgIA sobre los nAChRs $\alpha 3\beta 4$ y $\alpha 7$ bovinos, observada por Escalona (Escalona y col., 2006). Es posible que la toxina pudiera ejercer acciones específicas de especie, en línea con la mayor potencia (dos órdenes de magnitud) de la misma para inhibir los nAChRs $\alpha 9\alpha 10$ de la rata que los del hombre (Azam y McIntosh, 2012).

Particular atención merecen los resultados obtenidos en las neuronas DRG de rata. Dada la ausencia de la subunidad $\alpha 9$ y la incapacidad de la subunidad $\alpha 10$ para formar nAChRs homoméricos, el efecto inhibitor de la α -RgIA sobre las corrientes nicotínicas es indicativo de la presencia de un nAChR $\alpha 10$ heteromérico. La oclusión recíproca de los efectos inhibidores de α -RgIA y α -ArlB en estas células apunta ineludiblemente a la presencia de un nAChR formado por la combinación de las subunidades $\alpha 7$ y $\alpha 10$, circunstancia ésta que, sin embargo, no excluiría la existencia en esas células de nAChRs $\alpha 7$ homoméricos o heteroméricos con subunidades diferentes a la $\alpha 10$ (**Figura 5.1**). Estos resultados son también relevantes por revelar la existencia de nAChRs funcionales sensibles a α -RgIA en las neuronas nociceptivas de los ganglios espinales lumbares de la rata. Estas células resultan directamente dañadas en modelos de dolor neuropático como el de la constricción crónica del nervio ciático de la rata, en el que la α -RgIA ejerce un marcado efecto analgésico y neuroprotector (Vincler y col., 2006). Con independencia de la bien caracterizada acción antiinflamatoria de esta toxina (Di Cesare Mannelli y col., 2014), nuestros resultados apuntarían también a los nAChRs $\alpha 10^*$ de las neuronas nociceptivas primarias como potenciales dianas de su efecto analgésico.

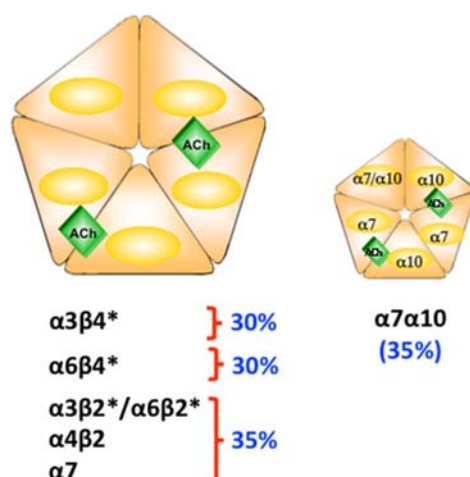


Figura 5.1. Composición relativa de los nAChRs de las neuronas DRG de la rata. El esquema izquierdo se basa en los resultados de Hone (Hone y col., 2012) y es consistente con los datos obtenidos en estudios previos (Genzen y col., 2001; Haberberger y col., 2004; Rau y col., 2005). Representa los distintos tipos de nAChRs identificados farmacológicamente en neuronas DRG. Las proporciones de los mismos pueden variar en los diferentes tipos de neuronas DRG, indicándose los porcentajes para el tipo II de Hone (Hone y col., 2012). El icono de la parte derecha deriva de los resultados relativos a la oclusión recíproca de los efectos de α -ArIB y α -RgIA, obtenidos en el presente trabajo. En él parecen representados solo dos de los posibles sitios de unión de la ACh (véase el ANEXO II). El símbolo “*” denota la posible presencia de otras subunidades.

Los resultados obtenidos en células cromafines de ratón mostraron que la ausencia de expresión de la subunidad $\alpha 9$ se asocia a una marcada disminución de la densidad de las corrientes nicotínicas, a la pérdida de efecto de la α -RgIA y a la reducción sustancial del efecto de la α -ArIB. Ello sugiere que la pérdida de la subunidad $\alpha 9$ no se ve compensada por la expresión de otras subunidades, y en particular por la $\alpha 7$ (Smith y col., Mol. Vis., 2014). Por otra parte, el fenómeno de oclusión de los efectos de α -ArIB y α -RgIA observado en las células cromafines de los animales control, junto con la ausencia de respuesta a la combinación de PNU282987 y PNU120596 indicaría que en esta especie animal la mayoría de las subunidades $\alpha 7$ y $\alpha 9$ se asociarían para constituir nAChRs heteroméricos $\alpha 7\alpha 9$, mientras que la formación de nAChRs homoméricos $\alpha 7$ y $\alpha 9$ sería mínima (**Figura 5.2**)

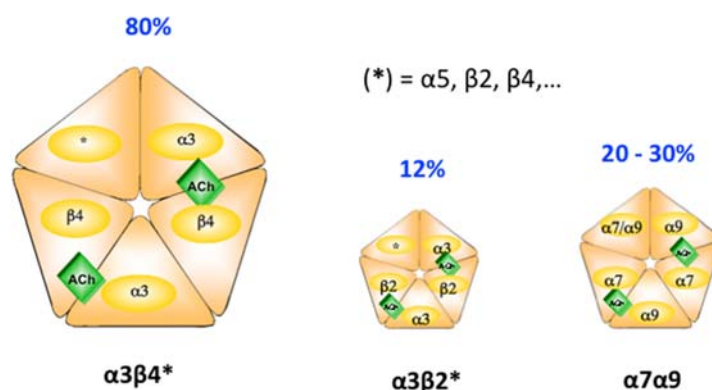


Figura 5.2. Composición relativa de los nAChRs de las células cromafines de ratón. La existencia de nAChRs α3β4* y α3β2* deriva de los resultados del trabajo de Pérez-Álvarez (Pérez-Álvarez y col., 2012) en el que se evaluaron los efectos de α-AuIB (3 μM) y α-MII (100 nM) sobre la corriente inducida por ACh. La presencia de nAChRs α7α9 deriva de los resultados de este trabajo. En el icono correspondiente aparecen representados solo dos de los posibles sitios de unión de la ACh. Las células cromafines de los animales α9 KO carecerían de nAChRs α7α9 (véase el ANEXO I). El símbolo “*” denota la posible presencia de otras subunidades.

Nuestros resultados sugieren la existencia de nAChRs heteroméricos funcionales formados por la combinación de la subunidad α7 con la α9 o la α10. Se trata de una hipótesis basada exclusivamente en evidencias farmacológicas (la oclusión de los efectos de toxinas selectivas, como la α-ArIB y la α-RgIA, de las distintas subunidades del heterómero) y el uso de sistemas nativos (células cromafines de ratón y neuronas DRG de rata) que expresan solo una de las dos parejas de subunidades constituyentes de esos nAChRs. Debe, no obstante, señalarse que, en línea con nuestros resultados y basándose en experimentos de doble marcaje fluorescente y transferencia de energía mediante resonancia (FRET), Lips (Lips y col., 2006) propusieron que las subunidades α7 y α10 se asocian físicamente en la membrana de las neuronas simpáticas de la rata. Existe, asimismo, abundante evidencia de la capacidad de la subunidad α7 para formar nAChRs heteroméricos mediante su combinación con la subunidad α3 (Maneu y col., 2002; El-Hajj y col., 2007), α5 (Girod y col., 1999; El-Hajj y col., 2007) y/o con las subunidades β2 (Khiroug y col., 2002; Murray y col., 2012), β3 (Palma y col., 1999) y β4 (Criado y col., 2012). Además, ha sido posible mediante registros de corrientes a través de canales individuales identificar en una misma preparación, las neuronas simpáticas de embriones de pollo, la presencia de nAChRs α7 con propiedades diferentes (conductancia unitaria, probabilidad de apertura, sensibilidad a MLA y α-Bgtx, etc.) para los que se han propuesto estructuras heteroméricas distintas (Yu y Role, 1998). Se trata, por tanto, de una hipótesis que aunque carece de un amplio soporte experimental en nuestras preparaciones presenta una razonable verosimilitud. En este sentido, es preciso señalar que al igual que sucede en los nAChRs α7 homoméricos (Palma y col., 1996), se considera que bastaría la unión de un sola molécula de un fármaco antagonista (la α-ArIB o la α-RgIA presentan números de Hill ≈ 1 en sus respectivas curvas concentración-respuesta (Vincler y col., 2006; Whiteaker y col., 2007; Clark y

col., 2008) para bloquear la activación de los nAChRs heteroméricos. A este respecto, conviene indicar que la α -RgIA dispondría de dos sitios de unión en los nAChRs $\alpha 9\alpha 10$, localizados en la interfase entre las subunidades $\alpha 10$ (sitio principal) y la $\alpha 9$ (sitio complementario), que estarían presentes las dos combinaciones estequiométricas fundamentales del heterómero ($\alpha 9_{(3)}\alpha 10_{(2)}$ y $\alpha 9_{(2)}\alpha 10_{(3)}$) (Azam y McIntosh, 2012; Indurthi y col., 2014; Azam y col., 2015). Por otra parte, la MLA y la α -BgTx, que poseen un perfil farmacológico distinto al de la α -RgIA, se unen al nAChR $\alpha 9\alpha 10$ en la interfase entre las subunidades $\alpha 9$ (sitio principal) y $\alpha 10$ (sitio complementario) (Zouridakis y col., 2014), mientras que la ACh se uniría a ambas interfases entre las subunidades $\alpha 9$ y $\alpha 10$ ($\alpha 9\alpha 10$ y $\alpha 10\alpha 9$) así como a la interfase existente entre las subunidades $\alpha 9$ (nAChR $\alpha 9_{(3)}\alpha 10_{(2)}$) (Indurthi y col., 2014; Azam y col., 2015). Esta serie de evidencias nos llevan a considerar que los experimentos de oclusión, basados en la combinación de dos fármacos antagonistas, constituyan un método fiable para la identificación de nAChRs heteroméricos.

La posible existencia de nAChRs funcionales formados por la combinación de la subunidad $\alpha 7$ con la $\alpha 9$ o con la $\alpha 10$ no ha sido investigada ex profeso en sistemas de expresión heteróloga de receptores ni, en consecuencia, se conoce cuál podría ser el efecto de la α -ArIB y la α -RgIA sobre las corrientes iónicas resultantes. Se trata de un problema que no es fácilmente abordable con una aproximación simple, dado que tanto las subunidades $\alpha 7$ como las $\alpha 9$ son capaces de formar nAChRs homoméricos y que la coinyección en ovocitos de *Xenopus laevis* de las subunidades $\alpha 7$ y $\alpha 10$ da lugar a corrientes fenotípicamente indistinguibles de las generadas tras la expresión solamente de las subunidades $\alpha 7$ (Elgoyhen y col., 2001). En nuestra opinión, una solución definitiva a este problema requeriría del empleo conjunto de técnicas bioquímicas (aislamiento de nAChRs heteroméricos mediante inmunoprecipitación seguida de inmunotransferencia; eliminación selectiva de la expresión de una subunidad nicotínica mediante oligonucleótidos antisentido) (Yu y Role, 1998; El-Hajj y col., 2007; Moretti y col., 2014), biofísicas (FRET) (Lips y col., 2006) y funcionales. Entre éstas, debería incluirse el registro de corrientes unitarias a través de nAChRs sensibles a α -ArIB y a α -RgIA (Ciuraszkiewicz y col., 2013) así como la expresión heteróloga de concatámeros formados por distintas combinaciones ($\alpha 7$ y $\alpha 9$, $\alpha 7$ y $\alpha 10$, etc.) de subunidades enlazadas (Zhou y col., 2003; Moretti y col., 2014).

Nuestros resultados indican también que la α -RgIA no modifica los principales canales iónicos (Na_v , K_v , BK, SK y Ca_v) responsables de la excitabilidad (espontánea e inducida mediante la inyección de corriente) eléctrica de las células cromafines de la rata. Además de reafirmar la selectividad del efecto de esta toxina sobre los nAChRs $\alpha 9^*$ y $\alpha 10^*$, este hallazgo posibilita el uso de esta toxina como herramienta experimental para estudiar el significado funcional de los nAChRs $\alpha 9^*$ y $\alpha 10^*$ en las células cromafines de la médula adrenal. Así mismo, la α -RgIA no parece interactuar con los receptores GABA_B modificando la amplitud de las corrientes a través de los canales Ca_v . Estos receptores no se expresan en la médula adrenal de la rata (Kato y col., 2014), lo

que explicaría la ausencia de efecto del baclofeno, el agonista prototipo de los receptores GABA_B, sobre las corrientes de Ca²⁺ dependientes de voltaje en las células cromafines de esa especie. Sin embargo, el baclofeno sí inhibió las corrientes de Ca²⁺ en las neuronas DRG de la rata, lo que confirma la expresión de receptores GABA_B en esta preparación y su capacidad para modular los canales Ca_v (Callaghan y col., 2008). Por el contrario, la α -RgIA no modificó la amplitud de las corrientes de Ca²⁺ en las neuronas DRG, lo que indica que carecería de actividad agonista de los receptores GABA_B. Estos resultados difieren de los publicados por el grupo de David Adams de la Universidad de Queensland (Callaghan y col., 2008; Callaghan y Adams, 2010), si bien coincidirían con los reportados por el grupo de Michael McIntosh (McIntosh y col., 2009; Wright y col., 2015).

Finalmente, nuestros resultados han puesto de manifiesto un efecto inhibitor del baclofeno sobre las corrientes nicotínicas de las células cromafines de rata. El estudio detallado de este efecto y su posible relevancia en la acción antiespástica (Enna y Bowery, 2004) antinociceptiva (Franek y col., 2004; Napier y col., 2012) de ese compuesto han quedado fuera de los objetivos de este trabajo.

5.2. CARACTERIZACIÓN FARMACOLÓGICA DE LOS nAChRs DE LAS CÉLULAS CROMAFINES DE LA MÉDULA ADRENAL DE LA RATA: PLASTICIDAD INDUCIDA POR EL FRÍO

La caracterización farmacológica de los nAChRs de las células cromafines de la medula adrenal realizada en este trabajo se ha basado en: i) la utilización de diversos agonistas nicotínicos (ACh, Nic, Oxo-M) con perfiles farmacológicos diferenciados (la ACh es el agonista nicotínico universal, mientras que la Nic se comporta como antagonista de los nAChRs $\alpha 9$ y $\alpha 9\alpha 10$ al tiempo que la Oxo-M muestra una cierta selectividad para activar a estos últimos) a concentraciones próximas a sus CE₅₀ en nuestro modelo experimental (Olivos-Oré, 2009); ii) el empleo de agonistas y moduladores específicos de determinados tipos de nAChRs, como el $\alpha 7$ homomérico (PNU282987 y PNU120596) o el $\alpha 4\beta 2$ (RJR2403); iii) la valoración del efecto de concentraciones máximas de antagonistas selectivos de distintos tipos de nAChRs sobre las respuestas inducidas por dichos agonistas; y iv) la administración simultánea o consecutiva de fármacos antagonistas con afinidad por diferentes subunidades formadoras de nAChRs heteroméricos. Todo ello nos ha permitido estimar la expresión relativa (haciendo abstracción de sus conductancias unitarias) de los distintos tipos de nAChRs en términos de su contribución a la corriente inducida por ACh. Adicionalmente, la respuesta a los fármacos agonistas ha posibilitado la detección de cambios en la expresión absoluta de algunos nAChRs. Debe señalarse que la concentración de ACh utilizada en nuestros experimentos (100 μ M) está próxima a la CE₅₀ de la mayoría de los nAChRs de la rata en sistemas de expresión heteróloga: 105 μ M ($\alpha 7$), 59 μ M ($\alpha 9$), 39 μ M ($\alpha 9\alpha 10$), 79 μ M ($\alpha 3\beta 4$), 81 μ M ($\alpha 3\alpha 5\beta 4$), 209 μ M ($\alpha 3\beta 2$) y 121 μ M ($\alpha 3\alpha 5\beta 2$) (Nelson y col., 2001; Virginio y col., 2002; Fucile y col., 2006). A pesar

del riesgo de subestimar la contribución de los nAChRs con CE50 más elevadas como los $\alpha 3\beta 2^*$, consideramos preferible utilizar esa concentración en vez de la CE₁₀₀ de la ACh (≈ 1 mM) al objeto de facilitar la actuación de los fármacos antagonistas y reducir la desensibilización de las respuestas.

La caracterización farmacológica se ha realizado en células cromafines procedentes de ratas control y de animales sometidos a un protocolo de estrés crónico por frío consistente en la exposición a una temperatura ambiente de 4 °C durante 5 días. Tres fueron los parámetros medidos, no relacionados con la expresión de nAChRs, para verificar el efecto de ese protocolo en nuestros animales: peso corporal, peso de las glándulas adrenales y contenido de CAs de las mismas. La reducción observada del peso de los animales, el aumento del tamaño de la glándulas así como la disminución del contenido de CAs son signos característicos de la respuesta al estrés sistémico por frío (Colomer y col., 2010) y nos permitieron acreditar la validez del modelo experimental en nuestros animales.

Por otra parte, los resultados de cualquier caracterización farmacológica deben ser compatibles con la información de tipo bioquímico relativa a las subunidades formadoras de nAChRs expresadas en el tipo celular objeto de estudio. De acuerdo a los trabajos publicados, las células cromafines de rata expresarían ARNm codificante para la práctica totalidad de las subunidades implicadas en la formación de nAChRs neuronales: $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\alpha 7$, $\alpha 9$, $\alpha 10$, $\beta 2$ y $\beta 4$ (Mousavi y col., 2001; Di Angelantonio y col., 2003; Olivos-Oré, 2009; Colomer y col., 2010). Así mismo, estudios inmunocitoquímicos, innumohistoquímicos y de inmunotransferencia han puesto de manifiesto la expresión de las proteínas correspondientes a todas esas subunidades, con la única excepción de la $\alpha 6$, cuya presencia no ha sido investigada (Di Angelantonio y col., 2003; Solís-Garrido, 2006; Olivos-Oré, 2009; Colomer y col., 2010). Resulta, por tanto, previsible que las células cromafines de rata alojen en su membrana una amplia variedad de nAChRs. A este respecto, experimentos de índole funcional (*patch-clamp*) (Yokotani y col., 2002; Di Angelantonio y col., 2003) sugirieron que los subtipos de nAChRs predominantes en las células cromafines de rata serían el $\alpha 3(\alpha 5)\beta 4$ y el $\alpha 3(\alpha 5)\beta 2$. Nuestros resultados en animales control, basados en el uso secuencial de concentraciones máximas de α -AuIB y α -MII, indican que los nAChRs $\alpha 3\beta 4^*$ y $\alpha 3\beta 2^*$ darían cuenta del 75% de la corriente activada por ACh, en concordancia con su carácter de nAChRs “ganglionares”. Más concretamente, los nAChRs $\alpha 3(\alpha 5)\beta 4$ serían responsables de aproximadamente el 40% de la corriente nicotínica (efecto bloqueante de α -AuIB tras la superfusión de α -MII y MLA; % inhibición por α -AuIB post- α -MII > MLA). El componente sensible a α -MII tras la administración de α -AuIB (20% de la corriente nicotínica) estaría formado por nAChRs $\alpha 3(\alpha 5)\beta 2$ y $\alpha 3(\alpha 6)\beta 2$. Éstos últimos nAChRs, que incorporan la subunidad $\alpha 6$, se verían implicados en el solapamiento de los efectos de MLA y α -MII y darían cuenta del 9% de la corriente inducida por ACh (% inhibición por α -MII - % inhibición por α -MII post-MLA). La expresión de nAChRs $\alpha 4\beta 2$ funcionales en las células cromafines de rata sería nula o muy pequeña a tenor de la incapacidad del agonista selectivo RJR

2403 para inducir corrientes iónicas. Este resultado concordaría con el de Yokotani (Yokotani y col., 2002), que, empleando el mismo compuesto, constataron la ausencia de respuesta secretora en las células cromafines de la rata, y sería compatible con el de Di Angelantonio (Di Angelantonio y col., 2003), que observaron que solo el 12% de las células cromafines presentaban inmunorreactividad para la subunidad $\alpha 4$.

Nuestros datos apuntan también a una expresión significativa de subunidades $\alpha 7$, $\alpha 9$ y $\alpha 10$ formadoras de nAChRs funcionales en razón de los efectos de la α -ArIB, de la α -RgIA y de la MLA sobre las corrientes inducidas por ACh. Estos resultados difieren de los publicados por el grupo de Andrea Nistri (Universidad de Trieste), que muestran que ni la α -Bgtx (1-10 μ M) ni la MLA (10-100 nM) modificaban las corrientes inducidas por Nic en células cromafines de rata (Khiroug y col., 1997; Di Angelantonio y col., 2000; Di Angelantonio y col., 2003). Sin embargo, el grupo de Nathalie Guerineau (Universidad de Montpellier) reportó que la α -Bgtx es capaz de reducir un 80% la frecuencia de sEPSCs en cortes de la glándula adrenal de la rata, lo que implicaría a las subunidades $\alpha 7$, $\alpha 9$ y/o $\alpha 10$ en la transmisión en la sinapsis esplacno-cromafin (Martin y col., 2003). Nuestros resultados complementan los de Guerineau a nivel postsináptico, ya que si bien la administración de PNU282987 no es capaz de inducir una respuesta de corriente en células cromafines aisladas, su asociación con PNU120596 origina corrientes iónicas de unos pocos pA sensibles a α -Bgtx pero resistentes a α -RgIA. Estos resultados sugieren que las células cromafines de rata expresan nAChRs $\alpha 7$ homoméricos funcionales, aunque en exigua proporción, lo cual contrasta con los marcados efectos inhibidores de α -ArIB (23%) sobre la corriente inducida por ACh. Ello sería indicativo de que la subunidad $\alpha 7$ podría formar parte de nAChRs heteroméricos también en las células cromafines de la rata.

Por otra parte, las evidencias farmacológicas que indican la presencia de nAChRs $\alpha 9^*$ y/o $\alpha 10^*$ en las células cromafines de rata se basan fundamentalmente en el empleo de α -RgIA. Así, la administración de α -RgIA comporta la inhibición del 28% de la corriente inducida por ACh y del 48% de la inducida por Oxo-M. Un hallazgo no esperado ha sido el efecto inhibidor (25%) de la α -RgIA sobre las corrientes inducidas por Nic, un compuesto que no activa –por el contrario, se comporta como un antagonista en razón de la interacción con aminoácidos específicos de las subunidades $\alpha 9$ y $\alpha 10$ – los nAChRs $\alpha 9\alpha 10$. Una posible explicación de estos resultados sería la de postular la existencia de nAChRs heteroméricos formados por las subunidades $\alpha 7$, $\alpha 9$ y/o $\alpha 10$. Esta hipótesis es consecuente con los hallazgos discutidos en el apartado anterior y compatible con el hecho de que la Nic se comporte como agonista sobre estos nAChRs heteroméricos, dado que la activación de otros nAChRs $\alpha 7$ heteroméricos, como los $\alpha 7\beta 2$, se produce en virtud de la unión de los fármacos agonistas a la interfase entre las subunidades $\alpha 7$ (Moretti y col., 2014). Los experimentos de oclusión de los efectos de α -RgIA y α -ArIB vendrían a confirmar la existencia de dichos heterómeros, en los que se integrarían el 50% de las subunidades $\alpha 7$ y el 62% de las

subunidades $\alpha 9$ y/o $\alpha 10$. Las subunidades restantes presumiblemente constituirían otros nAChRs $\alpha 7$ heteroméricos (con las subunidades $\beta 2$, $\beta 4$, etc.) así como nAChRs $\alpha 9\alpha 10$ (8% de la corriente nicotínica; % inhibición por α -RgIA post- α -ArlB) (Figura 5.3).

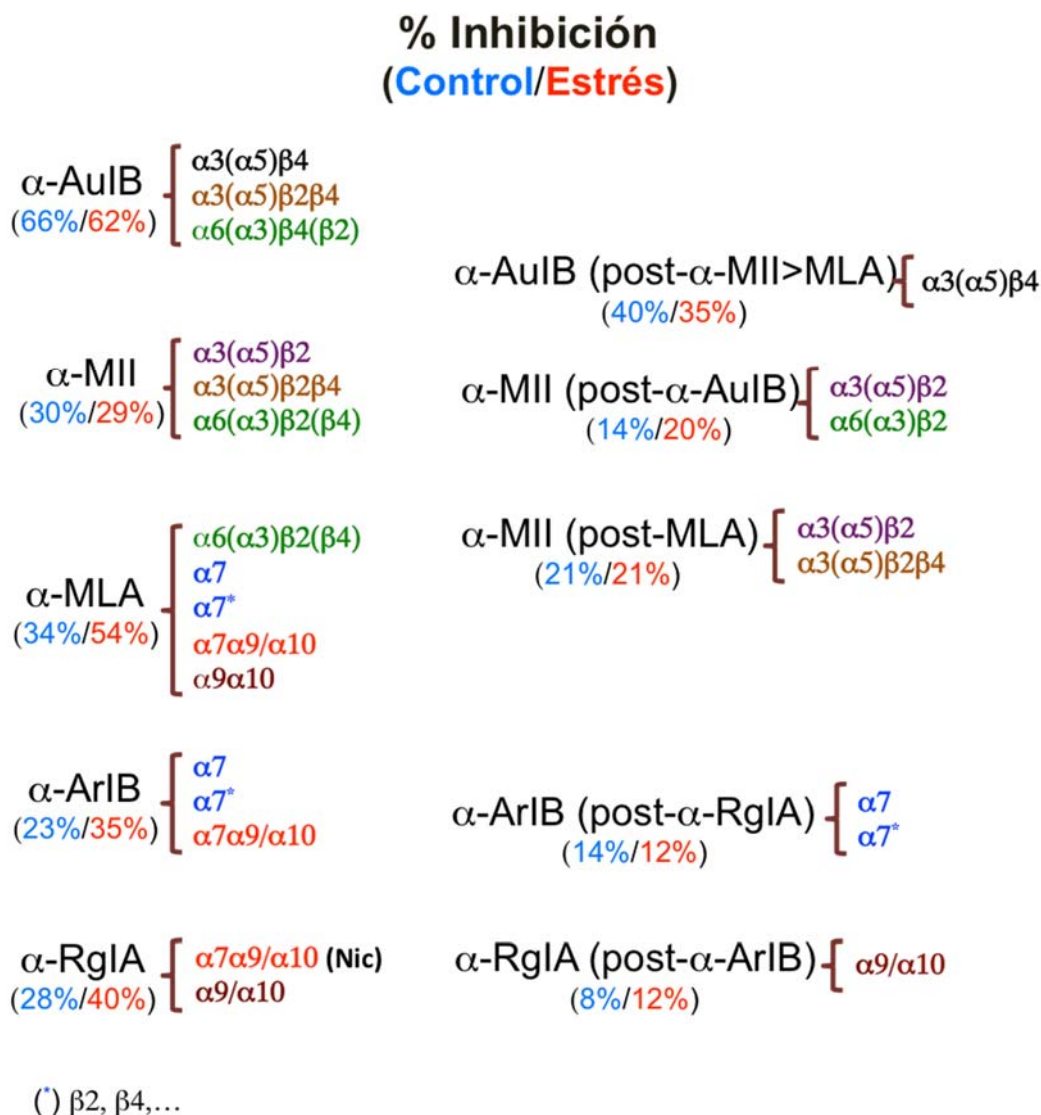


Figura 5.3. Porcentajes de inhibición de la corriente inducida por ACh producidos por diferentes antagonistas nicotínicos en células cromafines de rata procedentes de animales control (Control) y sometidas a un protocolo de estrés por frío (Estrés). Los porcentajes se han obtenido de experimentos en los que se emplearon tanto uno como varios antagonistas (protocolos de oclusión de los efectos de los antagonistas; porcentajes referidos como “antagonista (post-antagonista)”) (véase el ANEXO III). Cada uno de los paréntesis relaciona un antagonista y los nAChRs sensibles al mismo en cada condición. En la composición de algunos nAChRs se ha incluido la subunidad $\alpha 5$ (entre paréntesis, denotando su posible presencia) si bien carecemos de evidencia farmacológica que lo pruebe. El símbolo “/” indica que una o las dos subunidades adyacente pueden formar parte del nAChR., mientras que el símbolo “*” alude a la posible presencia de otras subunidades formadoras de nAChRs. Se ha empleado un código de colores diferente para cada tipo de nAChR.

Este trabajo se ha llevado a cabo en células cromafines aisladas y mantenidas en cultivo durante 1 o dos días, si bien hemos logrado reproducir en cortes de la glándula adrenal aquellos resultados relacionados con la expresión de nAChRs $\alpha 7$, $\alpha 9$ y $\alpha 10$. El uso de esta preparación resulta obligado para estudiar *ex vivo* la participación de cualquier nAChR en la transmisión sináptica entre las terminaciones colinérgicas del nervio esplácnico y las células cromafines. Debe señalarse, también, que diversos factores, tanto de índole técnica como biológica, pueden determinar variaciones en las poblaciones de nAChRs de las células cromafines entre las dos preparaciones, lo que adicionalmente nos movió al empleo de ambas. Dichos factores serían los siguientes: i) la existencia de barreras a la difusión de fármacos en los cortes de tejido con el consiguiente enlentecimiento de la cinética de administración y lavado de los fármacos. Esta circunstancia ha motivado la aplicación de pulsos de ACh de menor duración en los cortes (50 ms) que en las células aisladas (500 ms) y determina que probablemente la ACh solo logre acceder a los nAChRs situados en la cara de la membrana celular orientada hacia la superficie del baño; ii) el uso de pipetas de vidrio para la administración de fármacos en los cortes de tejido y con las que resulta muy difícil equilibrar rápidamente la concentración del fármaco que baña la célula con la existente en el interior de la pipeta; y iii) es posible que el aislamiento y consiguiente denervación de las células cromafines conlleve la sobreexpresión de los nAChRs durante el cultivo. Una consecuencia esperable, y que hemos observado, de todos estos factores sería la menor amplitud de las corrientes nicotínicas registradas en las células cromafines en cortes de tejido.

Ello no fue impedimento para que, al igual que se observó en las células cromafines aisladas, en las células en cortes de tejido adrenoglandular se detectase un aumento de la amplitud de las corrientes nicotínicas en los animales sometidos al protocolo de estrés por frío. Este incremento probablemente implica un aumento del número de nAChRs dado que en las células cromafines aisladas no se observó modificación alguna de la capacidad de la membrana celular, un indicador del área de la superficie de la membrana plasmática, lo que excluiría un aumento del tamaño (hipertrofia) de las células cromafines en los animales estresados. Sin embargo, en las células cromafines en cortes de tejido se observó un incremento de la capacidad celular que probablemente puede atribuirse al aumento de la comunicación intercelular mediada por uniones en hendidura (*gap-junctions*), fenómeno éste bien documentado en nuestro modelo experimental de estrés por frío en experimentos realizados tanto en cortes de tejido (Colomer y col., 2008) como *in vivo* (Desarmenien y col., 2013). Debe destacarse, además, que el empleo de cortes de tejido posibilitó, en razón de la medida de la amplitud de las EPSCs, concluir que el incremento de la densidad de nAChRs se producía también a nivel sináptico.

Con independencia del significado funcional de estos resultados en una sinapsis, como la esplanco-cromafín, con un elevado factor de seguridad, mayor relevancia pueden presentar aquellos otros que muestran cambios significativos en la contribución relativa de distintos tipos de nAChRs a la corriente nicotínica en los animales estresados. En concordancia, con los resultados de Miner (Miner y col., 1989), que describieron el aumento de sitios de fijación de α -Bgtx en membranas de la glándula adrenal de ratas estresadas por frío, así como los de Colomer (Colomer y col., 2010), que determinaron un aumento de la densidad de nAChRs $\alpha 9^*$ en el mismo modelo experimental, nuestros resultados ponen de manifiesto un aumento de los componentes de la corriente nicotínica sensibles a α -ArIB, α -RgIA y MLA, que involucrarían fundamentalmente a nAChRs formados por las subunidades $\alpha 7$, $\alpha 9$ y $\alpha 10$. Un análisis más detallado de nuestros resultados permite concluir que en los animales estresados se produce un aumento de la expresión de nAChRs $\alpha 7$ homoméricos (el PNU282887 per se activa corrientes nicotínicas), nAChRs $\alpha 9\alpha 10$ (aumento de la fracción sensible a α -RgIA post- α -ArIB) y de los nAChRs $\alpha 7\alpha 9/\alpha 10$ (aumento del componente de la corriente activada por Nic sensible a α -RgIA). El aumento de la fracción de nAChRs heteroméricos formados por las subunidades $\alpha 7$, $\alpha 9$ y/o $\alpha 10$ sería, además, congruente con el aumento de los porcentajes de esas subunidades implicados en su formación en las células cromafines aisladas y con el marcado solapamiento de los efectos de α -RgIA y α -ArIB en los cortes de tejido. Debe señalarse también que el aumento de la expresión de nAChRs $\alpha 9\alpha 10$ y/o $\alpha 7\alpha 9/\alpha 10$ tendría lugar, sin menoscabo de otras localizaciones, a nivel sináptico, a tenor del mayor efecto (% de inhibición) de la α -RgIA sobre las EPSCs en los animales estresados. Así mismo, la capacidad del PNU120596 para aumentar la amplitud de las sEPSCs y de la combinación de α -RgIA y α -ArIB para disminuir la frecuencia y amplitud de dichas corrientes, sugiere que los nAChRs $\alpha 7$ homoméricos y $\alpha 9\alpha 10$ y/o $\alpha 7\alpha 9/\alpha 10$ podrían localizarse también en las terminaciones del nervio esplácnico para facilitar la liberación de ACh en condiciones de estrés.

Los aumentos en el número de nAChRs formados por las subunidades $\alpha 7$, $\alpha 9$ y $\alpha 10$, que acabamos de referir, no se verían acompañados por cambios en la expresión de nAChRs $\alpha 6^*$ (% inhibición por α -MII - % inhibición por α -MII post-MLA), si bien podría asociarse a una disminución de los nAChRs $\alpha 3(\alpha 5)\beta 4$ (% inhibición por α -AuIB post- α -MII>MLA) (**Figura 5.3**).

Nuestros resultados constituyen la caracterización más completa desde el punto de vista farmacológico-funcional de los nAChRs de las células cromafines de cualquier especie animal. Además, el estudio se ha realizado de forma comparativa en células de animales control y sometidos aun protocolo de estrés térmico por frío. Nuestros hallazgos pueden ser concebidos como cambios adaptativos en la expresión de nAChRs de las células cromafines al objeto de poder satisfacer un incremento en las demandas orgánicas de CAs circulantes, necesario para asegurar la homeostasis metabólica y cardiocirculatoria en condiciones de estrés crónico por frío. Junto con el aumento en la expresión de las Cx43, Cx36 y Cx29, implicadas en la formación de uniones en hendidura entre las

células cromafines (Colomer y col., 2008; Colomer y col., 2010; Desarmenien y col., 2013) constituyen las principales modificaciones documentadas para este modelo de estrés crónico con impacto directo en el acoplamiento excitación-secreción de CAs por las células cromafines de la médula adrenal. Los nAChRs se encuentran en la cabecera de esta compleja vía de señalización. Es poco probable que un aumento en la densidad de la corriente nicotínica sea de particular importancia en este sistema, habida cuenta de que la activación de un solo nAChR es capaz de inducir el disparo de un potencial de acción en las células cromafines (Fenwick y col., 1982). Más relevante puede resultar el aumento en la expresión relativa de nAChRs formados por las subunidades $\alpha 7$, $\alpha 9$ y $\alpha 10$. Se trata de tres subunidades con elevada homología estructural, lo que posibilita una farmacología en buena medida común y propiedades biofísicas similares. Entre éstas, destaca la elevada permeabilidad al Ca^{2+} de los nAChRs que forman (Weisstaub y col., 2002; Fucile, 2004; Olivós-Oré, 2009).

5. 3. SIGNIFICADO FUNCIONAL DE LOS nAChRs $\alpha 9^*$ Y/O $\alpha 10^*$: ACOPLAMIENTO CON LOS CANALES SK

Actualmente se desconoce la función que desempeñan los nAChRs $\alpha 9^*$ y/o $\alpha 10^*$ con la excepción de los nAChRs $\alpha 9\alpha 10$ de la membrana de las células ciliadas externas de la cóclea. A ese nivel, los nAChRs $\alpha 9\alpha 10$ median la respuesta inhibitoria a la estimulación de la vía olivococlear que protege el epitelio sensorial frente a sonidos de elevada intensidad (Lustig, 2006). Esta respuesta se debe a la activación de canales SK por el Ca^{2+} que entra en la célula a través de los nAChRs $\alpha 9\alpha 10$. Se trata de un mecanismo de transducción único entre los nAChRs que los diferencia del carácter excitador (despolarizante) del resto de nAChRs, incluidos los homoméricos $\alpha 7$. Partiendo de este antecedente y de la bien conocida presencia de canales SK en las células cromafines aisladas de la médula adrenal de rata (Neely y Lingle, 1992; Vandael y col., 2012) decidimos investigar el acoplamiento funcional entre los nAChRs y los canales SK en las células cromafines en cortes de la glándula adrenal de la rata. En la estrategia seguida pueden diferenciarse 3 etapas: 1ª) puesta a punto del método de estimulación eléctrica de campo al objeto de inducir respuestas sinápticas debidas a la liberación de ACh por las terminaciones del nervio esplácnico; 2ª) caracterización funcional de los canales SK de las células cromafines en cortes de tejido adrenoglandular, y 3ª) estudio de los efectos de la α -RgIA sobre las respuestas sinápticas en ausencia y en presencia de apamina, un bloqueante específico de los canales SK.

Hemos empleado electrodos de tungsteno y aplicado estímulos bifásicos de intensidad máxima (± 50 V; 50 μs /fase) para obtener respuestas de corriente y de voltaje que por ser presentar latencias mínimas de 1 ms y ser bloqueadas por TTX y d-tubocurarina tenían un origen sináptico (EPSC y EPSPs). Asimismo, la morfología de las EPSCs (ausencia de indentaciones en la fase de

ascenso y de modificaciones sustanciales en la amplitud al aumentar la intensidad del estímulo) sugería que eran producidas por la ACh liberada desde un único botón sináptico. La estimulación a bajas frecuencias (desde 0,1 Hz hasta 1 Hz) generó respuestas sinápticas con eficacia superior al 75% y magnitud reproducible. No obstante, los EPSPs mostraron menor variabilidad que las EPSCs, probablemente como consecuencia de la rectificación de entrada de los nAChRs neuronales a potenciales negativos, lo que tendería a autolimitar la magnitud de la respuesta conforme la célula se despolariza. Ello probablemente permite reducir la inactivación de los canales Na_v facilitando así el disparo de potenciales de acción con cada EPSP. La probabilidad de aparición de potenciales de acción asociados a EPSPs disminuyó al aumentar la frecuencia de estimulación, pasando de un valor de 0,75 a la frecuencia de 0,1 Hz al de 0,40 a la de 10 Hz. Ésta última frecuencia es similar a la de disparo de las fibras simpáticas preganglioares en situaciones de estrés (Beacham y Perl, 1964; Fulop y col., 2005; Desarmenien y col., 2013), lo que sugiere que en esas situaciones se produciría un cierto grado de bloqueo por despolarización de la transmisión sináptica. A este bloqueo contribuiría también la existencia de EPSPs asincrónicas (ráfagas o *clusters* de EPSPs/EPSCs) que aumentarían el tiempo que la membrana de la célula cromafín permanece despolarizada (Holman y col., 1994; Barbara y Takeda, 1996). Debemos finalmente comentar la baja frecuencia de aparición de respuestas sinápticas espontáneas (sEPSCs/sEPSPs) e inducidas por la estimulación eléctrica (EPCs/EPSPs) en los cortes de la glándula adrenal de rata. Aunque esta frecuencia aumenta en las preparaciones procedentes de animales estresados por frío probablemente como consecuencia del aumento de la inervación simpática en la médula adrenal (Colomer y col., 2008), su valor no ha superado el 10%, lo cual ha dificultado sobremanera el estudio del problema objeto de discusión en este apartado.

El empleo de apamina, un bloqueante selectivo de los canales SK, nos ha permitido establecer su participación en el control de la excitabilidad de las células cromafines de rata, que disparan espontáneamente potenciales de acción que en el seno del tejido adrenomedular. Ello determina que los canales SK se encuentren tónicamente activados y, consiguientemente, contribuyan al V_r de las células cromafines. En estas células, los canales SK son los principales responsables del componente lento de la AHP (Albinana y col., 2015) que regula el intervalo entre potenciales de acción disminuyendo la frecuencia de los mismos. El aumento progresivo de la AHP debida a la acumulación de Ca^{2+} en interior celular durante un tren de potenciales de acción inducidos por la inyección de corriente despolarizante ocasiona el fenómeno de acomodación de la frecuencia de descarga, lo que posibilita el disparo sostenido de potenciales de acción con mínima atenuación de su amplitud (Vandael y col., 2012).

Nuestros resultados indican que los canales SK se activan por elevaciones de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ secundarias tanto a la entrada de Ca^{2+} a través de canales activados por la despolarización de la membrana (canales Ca_v) como activados por ligando (nAChRs), y que ambos mecanismos

contribuirían a modificar la amplitud y duración de los EPSPs en la sinapsis esplanco-cromafín. La idea de que la entrada de Ca^{2+} a través de nAChRs es capaz de activar los canales SK se basa en los efectos de la apamina sobre la cinética de la EPSCs, que en nuestras condiciones experimentales (baja frecuencia de estimulación y sensibilidad a la d-tubocurarina) se deben exclusivamente a la acción de la ACh liberada por las terminaciones del nervio esplácnico sobre nAChRs presentes en la membrana de las células cromafines (Stroth y col., 2013). Estos resultados confirmarían, en condiciones próximas a las fisiológicas, los obtenidos previamente en células cromafines aisladas de la médula adrenal de rata estimuladas con ACh (100 μM , 1 s) y bañadas en una solución extracelular rica en K^+ (30 mM). En esas condiciones experimentales, en las que E_K es positivo (≈ -45 mV) respecto a V_h (-90 mV), la apamina acelera la caída de la respuesta nicotínica al bloquear una corriente de entrada de K^+ cuya amplitud aumenta conforme se aplica la ACh (Olivos-Oré, 2009). Mediante la disminución de la duración de los EPSPs, los canales SK podrían aumentar el tiempo de recuperación de la inactivación de los canales Na_v evitando el bloqueo por despolarización de la transmisión sináptica, especialmente a altas frecuencias de estimulación. Ello, a su vez, posibilitaría el aumento de la respuesta secretora de CAs al objeto de poder satisfacer las necesidades del organismo en situaciones de estrés.

¿Cuál sería el papel de los nAChRs $\alpha 9^*$ y/o $\alpha 10^*$ en la modulación de la duración de las respuestas sinápticas de la célula cromafín por los canales SK? Para responder a esta pregunta hemos evaluado los efectos de la α -RgIA en ausencia y en presencia de apamina. La capacidad de α -RgIA para mimetizar los efectos de la apamina y la de ésta para ocluir los efectos de la primera, constituyen la base argumental utilizada para implicar a los nAChRs $\alpha 9^*$ y/o $\alpha 10^*$ en la activación de los canales SK. Nuestros resultados muestran cómo la α -RgIA, al igual que la apamina, suprime el fenómeno de adaptación de la frecuencia de disparo de potenciales de acción inducidos por la administración de ACh, lo que ocasiona la disminución continua de la amplitud de los mismos. Conviene señalar, que estos efectos se producen a pesar de que la α -RgIA puede disminuir la despolarización inducida por ACh y, consiguientemente, la frecuencia inicial de la descarga de potenciales de acción. Los resultados obtenidos en relación a los efectos de la α -RgIA sobre las EPSCs son también similares a los observados con la apamina. Así, la administración de α -RgIA prolonga la fase de caída de las EPSCs independientemente de su capacidad para reducir la amplitud de las mismas. Finalmente, el hecho de que la apamina ocluya el efecto de la α -RgIA sobre la cinética de las EPSCs sugiere que ambas toxinas actúan por un mecanismo común consistente en la inhibición directa (la apamina) o indirecta (la α -RgIA) de los canales SK. Los presentes resultados corroboran los obtenidos previamente sobre las sEPSCs, cuya cinética se vio enlentecida (aumento del porcentaje de corrientes sinápticas con cinética biexponencial e incremento de la duración del componente lento de las mismas) en presencia de α -RgIA (Olivos-Oré, 2009).

En conjunto, nuestros resultados sugieren que los nAChRs $\alpha 9^*$ y $\alpha 10^*$ modulan la transmisión sináptica en la unión esplacno-cromafín facilitando la liberación de ACh (nAChRs presinápticos) y acortando la duración de las EPSCs/EPSPs y, por tanto, pudiendo prevenir el bloqueo por despolarización de la descarga de potenciales de acción (nAChRs postsinápticos). La mayor expresión de estos nAChRs en condiciones de estrés crónico posibilitaría el incremento de la respuesta secretora de CAs por las células cromafines no solo de forma aguda (respuesta de lucha o huida) sino también crónica (estrés psicosocial, ejercicio físico extenuante, etc.).

VI. CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo y de la discusión de los mismos, podemos formular las siguientes conclusiones:

- 1^a. La α -RgIA antagoniza selectivamente los nAChRs $\alpha 9^*$ y/o $\alpha 10^*$ careciendo de efecto sobre los canales Na_v , Ca_v , K_v , BK, SK y los receptores $GABA_B$.
- 2^a. Las subunidades $\alpha 9$ y $\alpha 10$ pueden asociarse entre sí y con la subunidad $\alpha 7$ para formar nAChRs heteroméricos en las células cromafines de rata y de ratón, y en las neuronas DRG de la rata.
- 3^a. Las células cromafines de la rata expresan predominantemente nAChRs de los tipos $\alpha 3(\alpha 5)\beta 4^*$, $\alpha 3(\alpha 5)\beta 2^*$, $\alpha 7\alpha 9/\alpha 10$ y $\alpha 9\alpha 10$; con carácter minoritario, expresarían nAChRs $\alpha 7$ homoméricos.
- 4^a. La expresión de nAChRs $\alpha 7$ homoméricos, $\alpha 9\alpha 10$ y $\alpha 7\alpha 9/\alpha 10$ se incrementa en las células cromafines de ratas estresadas crónicamente por frío.
- 5^a. Los nAChRs $\alpha 9^*$ y/o $\alpha 10^*$ se encuentran funcionalmente acoplados a los canales SK en la membrana de la célula cromafín; este acoplamiento permite acortar la duración de los EPSPs previniendo el bloqueo por despolarización de la transmisión sináptica en la unión esplacno-cromafín; los nAChRs $\alpha 9^*$ y/o $\alpha 10^*$ actuarían también a nivel presináptico favoreciendo la liberación de ACh.
- 6^a. La capacidad de los nAChRs $\alpha 9^*$ y/o $\alpha 10^*$ para facilitar la transmisión en la unión esplacno-cromafín y el aumento de su expresión en condiciones de estrés crónico posibilitarían el incremento de la respuesta secretora de CAs por las células cromafines para satisfacer las demandas del organismo tanto de forma aguda como crónica.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Adams, D. J., Dwyer, T. M. and Hille, B. The permeability of endplate channels to monovalent and divalent metal cations. *J Gen Physiol.* 1980; 75: 493-510.
2. Adams, D. J. and Nutter, T. J. Calcium permeability and modulation of nicotinic acetylcholine receptor-channels in rat parasympathetic neurons. *J Physiol Paris.* 1992; 86: 67-76.
3. Afework, S. True hermaphroditism: a case report. *Ethiop Med J.* 1988; 26: 147-9.
4. Akaike, A., Mine, Y., Sasa, M. and Takaori, S. A patch clamp study of muscarinic excitation of the rat adrenal chromaffin cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 1990a; 255: 340-5.
5. Akaike, A., Mine, Y., Sasa, M. and Takaori, S. Voltage and current clamp studies of muscarinic and nicotinic excitation of the rat adrenal chromaffin cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 1990b; 255: 333-9.
6. Akana, S. F., Dallman, M. F., Bradbury, M. J., Scribner, K. A., Strack, A. M. and Walker, C. D. Feedback and facilitation in the adrenocortical system: unmasking facilitation by partial inhibition of the glucocorticoid response to prior stress. *Endocrinology.* 1992; 131: 57-68.
7. Albillos, A., Dernick, G., Horstmann, H., Almers, W., Álvarez de Toledo, G. and Lindau, M. The exocytotic event in chromaffin cells revealed by patch amperometry. *Nature.* 1997; 389: 509-12.
8. Albillos, A., Neher, E. and Moser, T. R-Type Ca^{2+} channels are coupled to the rapid component of secretion in mouse adrenal slice chromaffin cells. *J Neurosci.* 2000; 20: 8323-30.
9. Albinana, E., Segura-Chama, P., Baraibar, A. M., Hernandez-Cruz, A. and Hernandez-Guijo, J. M. Different contributions of calcium channel subtypes to electrical excitability of chromaffin cells in rat adrenal slices. *J Neurochem.* 2015; 133: 511-21.
10. Albuquerque, E. X., Pereira, E. F., Alkondon, M. and Rogers, S. W. Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function. *Physiol Rev.* 2009; 89: 73-120.
11. Alkondon, M. and Albuquerque, E. X. Diversity of nicotinic acetylcholine receptors in rat hippocampal neurons. I. Pharmacological and functional evidence for distinct structural subtypes. *J Pharmacol Exp Ther.* 1993; 265: 1455-73.
12. Alkondon, M., Pereira, E. F., Cortes, W. S., Maelicke, A. and Albuquerque, E. X. Choline is a selective agonist of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors in the rat brain neurons. *Eur J Neurosci.* 1997; 9: 2734-42.
13. Amador, M. and Dani, J. A. Mechanism for modulation of nicotinic acetylcholine receptors that can influence synaptic transmission. *J Neurosci.* 1995; 15: 4525-32.
14. Anderson, D. J., Mostov, K. E. and Blobel, G. Mechanisms of integration of de novo-synthesized polypeptides into membranes: signal-recognition particle is required for integration into microsomal membranes of calcium ATPase and of lens MP26 but not of cytochrome b5. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1983; 80: 7249-53.
15. Antoni, F. A. Hypothalamic control of adrenocorticotropin secretion: advances since the discovery of 41-residue corticotropin-releasing factor. *Endocr Rev.* 1986; 7: 351-78.
16. Artalejo, A. R. La maquinaria molecular de la exocitosis en las células cromafines de la médula adrenal. *Anal. Real Acad. Farm.* 2005; 71: 127-151.
17. Artalejo, A. R., García, A. G. and Neher, E. Small-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels in bovine chromaffin cells. *Pflugers Arch.* 1993; 423: 97-103.
18. Auerbach, A. and Akk, G. Desensitization of mouse nicotinic acetylcholine receptor channels. A two-gate mechanism. *J Gen Physiol.* 1998; 112: 181-97.
19. Augustine, G. J. and Neher, E. Calcium requirements for secretion in bovine chromaffin cells. *J Physiol.* 1992; 450: 247-71.
20. Aunis, D. and Langley, K. Physiological aspects of exocytosis in chromaffin cells of the adrenal medulla. *Acta Physiol Scand.* 1999; 167: 89-97.
21. Avila, A. M., Davila-García, M. I., Ascarrunz, V. S., Xiao, Y. and Kellar, K. J. Differential regulation of nicotinic acetylcholine receptors in PC12 cells by nicotine and nerve growth factor. *Mol Pharmacol.* 2003; 64: 974-86.
22. Azam, L. and McIntosh, J. M. Molecular basis for the differential sensitivity of rat and human $\alpha 9\alpha 10$ nAChRs to α -conotoxin RgIA. *J Neurochem.* 2012.
23. Azam, L., Papakyriakou, A., Zouridakis, M., Giastas, P., Tzartos, S. J. and McIntosh, J. M. Molecular interaction of α -conotoxin RgIA with the rat $\alpha 9\alpha 10$ nicotinic acetylcholine receptor. *Mol Pharmacol.* 2015; 87: 855-64.

24. Azam, L., Winzer-Serhan, U. and Leslie, F. M. Co-expression of alpha7 and beta2 nicotinic acetylcholine receptor subunit mRNAs within rat brain cholinergic neurons. *Neuroscience*. 2003; 119: 965-77.
25. Azam, L., Winzer-Serhan, U. H., Chen, Y. and Leslie, F. M. Expression of neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit mRNAs within midbrain dopamine neurons. *J Comp Neurol*. 2002; 444: 260-74.
26. Azam, L., Yoshikami, D. and McIntosh, J. M. Amino acid residues that confer high selectivity of the alpha6 nicotinic acetylcholine receptor subunit to alpha-conotoxin MII[S4A,E11A,L15A]. *J Biol Chem*. 2008; 283: 11625-32.
27. Badía, A. and Baños, J. E. Fármacos bloqueantes de la placa motriz y bloqueantes ganglionares. *Farmacología Humana* (5ª edición). 2003; 297-314.
28. Ballesteros, J. A., Plazas, P. V., Kracun, S., Gómez-Casati, M. E., Taranda, J., Rothlin, C. V., Katz, E., Millar, N. S. and Elgoyhen, A. B. Effects of quinine, quinidine, and chloroquine on alpha9alpha10 nicotinic cholinergic receptors. *Mol Pharmacol*. 2005; 68: 822-9.
29. Banks, B. E., Brown, C., Burgess, G. M., Burnstock, G., Claret, M., Cocks, T. M. and Jenkinson, D. H. Apamin blocks certain neurotransmitter-induced increases in potassium permeability. *Nature*. 1979; 282: 415-7.
30. Barbara, J. G., Poncer, J. C., McKinney, R. A. and Takeda, K. An adrenal slice preparation for the study of chromaffin cells and their cholinergic innervation. *J Neurosci Methods*. 1998; 80: 181-9.
31. Barbara, J. G. and Takeda, K. Quantal release at a neuronal nicotinic synapse from rat adrenal gland. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996; 93: 9905-9.
32. Baruchin, A., Vollmer, R. R., Miner, L. L., Sell, S. L., Stricker, E. M. and Kaplan, B. B. Cold-induced increases in phenylethanolamine N-methyltransferase (PNMT) mRNA are mediated by non-cholinergic mechanisms in the rat adrenal gland. *Neurochem Res*. 1993; 18: 759-66.
33. Baruchin, A., Weisberg, E. P., Miner, L. L., Ennis, D., Nisenbaum, L. K., Naylor, E., Stricker, E. M., Zigmond, M. J. and Kaplan, B. B. Effects of cold exposure on rat adrenal tyrosine hydroxylase: an analysis of RNA, protein, enzyme activity, and cofactor levels. *J Neurochem*. 1990; 54: 1769-75.
34. Beacham, W. S. and Perl, E. R. Background and Reflex Discharge of Sympathetic Preganglionic Neurons in the Spinal Cat. *J Physiol*. 1964; 172: 400-16.
35. Bencherif, M., Lovette, M. E., Fowler, K. W., Arrington, S., Reeves, L., Caldwell, W. S. and Lippiello, P. M. RJR-2403: a nicotinic agonist with CNS selectivity I. In vitro characterization. *J Pharmacol Exp Ther*. 1996; 279: 1413-21.
36. Bertrand, D., Galzi, J. L., Devillers-Thiery, A., Bertrand, S. and Changeux, J. P. Mutations at two distinct sites within the channel domain M2 alter calcium permeability of neuronal alpha 7 nicotinic receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993; 90: 6971-5.
37. Bezanilla, F. and Armstrong, C. M. Inactivation of the sodium channel. I. Sodium current experiments. *J Gen Physiol*. 1977; 70: 549-66.
38. Bhatnagar, S. and Dallman, M. Neuroanatomical basis for facilitation of hypothalamic-pituitary-adrenal responses to a novel stressor after chronic stress. *Neuroscience*. 1998; 84: 1025-39.
39. Biallas, S., Wilker, S., Lips, K. S., Kummer, W., Grando, S. A., Padberg, W. and Grau, V. Immunohistochemical detection of nicotinic acetylcholine receptor subunits alpha9 and alpha10 in rat lung isografts and allografts. *Life Sci*. 2007; 80: 2286-9.
40. Bixel, M. G., Weise, C., Bolognesi, M. L., Rosini, M., Brierly, M. J., Mellor, I. R., Usherwood, P. N., Melchiorre, C. and Hucho, F. Location of the polyamine binding site in the vestibule of the nicotinic acetylcholine receptor ion channel. *J Biol Chem*. 2001; 276: 6151-60.
41. Blanchet, C., Erostequi, C., Sugawara, M. and Dulon, D. Acetylcholine-induced potassium current of guinea pig outer hair cells: its dependence on a calcium influx through nicotinic-like receptors. *J Neurosci*. 1996; 16: 2574-84.
42. Blanchet, C., Erostequi, C., Sugawara, M. and Dulon, D. Gentamicin blocks ACh-evoked K⁺ current in guinea-pig outer hair cells by impairing Ca²⁺ entry at the cholinergic receptor. *J Physiol*. 2000; 525 Pt 3: 641-54.
43. Blount, P. and Merlie, J. P. Molecular basis of the two nonequivalent ligand binding sites of the muscle nicotinic acetylcholine receptor. *Neuron*. 1989; 3: 349-57.
44. Bocquet, N., Nury, H., Baaden, M., Le Poupon, C., Changeux, J. P., Delarue, M. and Corringer, P. J. X-ray structure of a pentameric ligand-gated ion channel in an apparently open conformation. *Nature*. 2009; 457: 111-4.

45. Bocquet, N., Prado de Carvalho, L., Cartaud, J., Neyton, J., Le Poupon, C., Taly, A., Grutter, T., Changeux, J. P. and Corringer, P. J. A prokaryotic proton-gated ion channel from the nicotinic acetylcholine receptor family. *Nature*. 2007; 445: 116-9.
46. Bodnar, A. L., Cortes-Burgos, L. A., Cook, K. K., Dinh, D. M., Groppi, V. E., Hajos, M., Higdon, N. R., Hoffmann, W. E., Hurst, R. S., Myers, J. K., Rogers, B. N., Wall, T. M., Wolfe, M. L. and Wong, E. Discovery and structure-activity relationship of quinuclidine benzamides as agonists of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors. *J Med Chem*. 2005; 48: 905-8.
47. Booker, T. K., Smith, K. W., Dodrill, C. and Collins, A. C. Calcium modulation of activation and desensitization of nicotinic receptors from mouse brain. *J Neurochem*. 1998; 71: 1490-500.
48. Boorman, J. P., Beato, M., Groot-Kormelink, P. J., Broadbent, S. D. and Sivilotti, L. G. The effects of $\beta 3$ subunit incorporation on the pharmacology and single channel properties of oocyte-expressed human $\alpha 3\beta 4$ neuronal nicotinic receptors. *J Biol Chem*. 2003; 278: 44033-40.
49. Boulter, J., Evans, K., Goldman, D., Martin, G., Treco, D., Heinemann, S. and Patrick, J. Isolation of a cDNA clone coding for a possible neural nicotinic acetylcholine receptor α -subunit. *Nature*. 1986; 319: 368-74.
50. Boulter, J., O'Shea-Greenfield, A., Duvoisin, R. M., Connolly, J. G., Wada, E., Jensen, A., Gardner, P. D., Ballivet, M., Deneris, E. S., McKinnon, D. and et al. $\alpha 3$, $\alpha 5$, and $\beta 4$: three members of the rat neuronal nicotinic acetylcholine receptor-related gene family form a gene cluster. *J Biol Chem*. 1990; 265: 4472-82.
51. Boyd, R. T. The molecular biology of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Crit Rev Toxicol*. 1997; 27: 299-318.
52. Brandt, B. L., Hagiwara, S., Kidokoro, Y. and Miyazaki, S. Action potentials in the rat chromaffin cell and effects of acetylcholine. *J Physiol*. 1976; 263: 417-39.
53. Brejc, K., van Dijk, W. J., Klaassen, R. V., Schuurmans, M., van Der Oost, J., Smit, A. B. and Sixma, T. K. Crystal structure of an ACh-binding protein reveals the ligand-binding domain of nicotinic receptors. *Nature*. 2001; 411: 269-76.
54. Bruggmann, D., Lips, K. S., Pfeil, U., Haberberger, R. V. and Kummer, W. Multiple nicotinic acetylcholine receptor α -subunits are expressed in the arterial system of the rat. *Histochem Cell Biol*. 2002; 118: 441-7.
55. Bruggmann, D., Lips, K. S., Pfeil, U., Haberberger, R. V. and Kummer, W. Rat arteries contain multiple nicotinic acetylcholine receptor α -subunits. *Life Sci*. 2003; 72: 2095-9.
56. Bunker, G. L. and Nishi, R. Developmental cell death in vivo: rescue of neurons independently of changes at target tissues. *J Comp Neurol*. 2002; 452: 80-92.
57. Burgoyne, R. D. Control of exocytosis in adrenal chromaffin cells. *Biochim Biophys Acta*. 1991; 1071: 174-202.
58. Burgoyne, R. D., Morgan, A., Robinson, I., Pender, N. and Cheek, T. R. Exocytosis in adrenal chromaffin cells. *J Anat*. 1993; 183 (Pt 2): 309-14.
59. Caldwell, J. H., Schaller, K. L., Lasher, R. S., Peles, E. and Levinson, S. R. Sodium channel $\text{Na(v)}1.6$ is localized at nodes of ranvier, dendrites, and synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000; 97: 5616-20.
60. Callaghan, B. and Adams, D. J. Analgesic α -conotoxins Vc1.1 and Rg1A inhibit N-type calcium channels in sensory neurons of $\alpha 9$ nicotinic receptor knockout mice. *Channels (Austin)*. 2010; 4: 51-4.
61. Callaghan, B., Haythornthwaite, A., Berecki, G., Clark, R. J., Craik, D. J. and Adams, D. J. Analgesic α -conotoxins Vc1.1 and Rg1A inhibit N-type calcium channels in rat sensory neurons via GABAB receptor activation. *J Neurosci*. 2008; 28: 10943-51.
62. Calleja-Macias, I., Osann, K., Remedios-Chan, M., Barrera-Saldana, H. A., Illades-Aguiar, B., Anton-Culver, H., Chikova, A. K., Grando, S. A. and Bernard, H. U. Association of single nucleotide polymorphisms of nicotinic acetylcholine receptor subunits with cervical neoplasia. *Life Sci*. 2012; 91: 1099-102.
63. Campos-Caro, A., Smillie, F. I., Domínguez del Toro, E., Rovira, J. C., Vicente-Agullo, F., Chapuli, J., Juiz, J. M., Sala, S., Sala, F., Ballesta, J. J. and Criado, M. Neuronal nicotinic acetylcholine receptors on bovine chromaffin cells: cloning, expression, and genomic organization of receptor subunits. *J Neurochem*. 1997; 68: 488-97.
64. Cannon, W. B. Organization for physiological homeostasis. *Physiol Rev*. 1929; 9: 399-431.

65. Carabelli, V., Marcantoni, A., Comunanza, V. and Carbone, E. Fast exocytosis mediated by T- and L-type channels in chromaffin cells: distinct voltage-dependence but similar Ca^{2+} -dependence. *Eur Biophys J.* 2007a; 36: 753-62.
66. Carabelli, V., Marcantoni, A., Comunanza, V., de Luca, A., Diaz, J., Borges, R. and Carbone, E. Chronic hypoxia up-regulates $\alpha 1\text{H}$ T-type channels and low-threshold catecholamine secretion in rat chromaffin cells. *J Physiol.* 2007b; 584: 149-65.
67. Carrasco-Serrano, C. and Criado, M. Glucocorticoid activation of the neuronal nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 7$ subunit gene: involvement of transcription factor Egr-1. *FEBS Lett.* 2004; 566: 247-50.
68. Carrasco, G. A. and Van de Kar, L. D. Neuroendocrine pharmacology of stress. *Eur J Pharmacol.* 2003; 463: 235-72.
69. Cartier, G. E., Yoshikami, D., Gray, W. R., Luo, S., Olivera, B. M. and McIntosh, J. M. A new α -conotoxin which targets $\alpha 3\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptors. *J Biol Chem.* 1996; 271: 7522-8.
70. Castelan, F., Castillo, M., Mulet, J., Sala, S., Sala, F., Domínguez Del Toro, E. and Criado, M. Molecular characterization and localization of the RIC-3 protein, an effector of nicotinic acetylcholine receptor expression. *J Neurochem.* 2008; 105: 617-27.
71. Castillo, M., Mulet, J., Gutiérrez, L. M., Ortiz, J. A., Castelan, F., Gerber, S., Sala, S., Sala, F. and Criado, M. Dual role of the RIC-3 protein in trafficking of serotonin and nicotinic acetylcholine receptors. *J Biol Chem.* 2005; 280: 27062-8.
72. Castro, N. G. and Albuquerque, E. X. α -Bungarotoxin-sensitive hippocampal nicotinic receptor channel has a high calcium permeability. *Biophys J.* 1995; 68: 516-24.
73. Cattaneo, M. G., Codignola, A., Vicentini, L. M., Clementi, F. and Sher, E. Nicotine stimulates a serotonergic autocrine loop in human small-cell lung carcinoma. *Cancer Res.* 1993; 53: 5566-8.
74. Catterall, W. A., Chandy, K. G. and Gutman, G. A. The IUPHAR Compendium of Voltage-gated Ion Channels. *IUPHAR Media.* 2002;
75. Catterall, W. A., Goldin, A. L. and Waxman, S. G. International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated sodium channels. *Pharmacol Rev.* 2005; 57: 397-409.
76. Celie, P. H., Klaassen, R. V., van Rossum-Fikkert, S. E., van Elk, R., van Nierop, P., Smit, A. B. and Sixma, T. K. Crystal structure of acetylcholine-binding protein from *Bulinus truncatus* reveals the conserved structural scaffold and sites of variation in nicotinic acetylcholine receptors. *J Biol Chem.* 2005; 280: 26457-66.
77. Celie, P. H., van Rossum-Fikkert, S. E., van Dijk, W. J., Brejc, K., Smit, A. B. and Sixma, T. K. Nicotine and carbamylcholine binding to nicotinic acetylcholine receptors as studied in AChBP crystal structures. *Neuron.* 2004; 41: 907-14.
78. Cena, V., Nicolas, G. P., Sánchez-García, P., Kirpekar, S. M. and García, A. G. Pharmacological dissection of receptor-associated and voltage-sensitive ionic channels involved in catecholamine release. *Neuroscience.* 1983; 10: 1455-62.
79. Ciuraszkiewicz, A., Schreibmayer, W., Platzer, D., Orr-Urtreger, A., Scholze, P. and Huck, S. Single-channel properties of $\alpha 3\beta 4$, $\alpha 3\beta 4\alpha 5$ and $\alpha 3\beta 4\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptors in mice lacking specific nicotinic acetylcholine receptor subunits. *J Physiol.* 2013; 591: 3271-88.
80. Clark, R. J., Daly, N. L., Halai, R., Nevin, S. T., Adams, D. J. and Craik, D. J. The three-dimensional structure of the analgesic α -conotoxin, RgIA. *FEBS Lett.* 2008; 582: 597-602.
81. Clarke, P. B. The fall and rise of neuronal α -bungarotoxin binding proteins. *Trends Pharmacol Sci.* 1992; 13: 407-13.
82. Clarke, P. B. and Reuben, M. Release of $[3\text{H}]$ -noradrenaline from rat hippocampal synaptosomes by nicotine: mediation by different nicotinic receptor subtypes from striatal $[3\text{H}]$ -dopamine release. *Br J Pharmacol.* 1996; 117: 595-606.
83. Codignola, A., Tarroni, P., Cattaneo, M. G., Vicentini, L. M., Clementi, F. and Sher, E. Serotonin release and cell proliferation are under the control of α -bungarotoxin-sensitive nicotinic receptors in small-cell lung carcinoma cell lines. *FEBS Lett.* 1994; 342: 286-90.
84. Coggan, J. S. and Thompson, S. H. Cholinergic modulation of the Ca^{2+} response to bradykinin in neuroblastoma cells. *Am J Physiol.* 1997; 273: C612-7.
85. Cole, K. S. Dynamic electrical characteristics of the squid axon membrane. *Arch Sci Physiol.* 1949; 3: 253-258.

86. Cole, M. A., Kalman, B. A., Pace, T. W., Topczewski, F., Lowrey, M. J. and Spencer, R. L. Selective blockade of the mineralocorticoid receptor impairs hypothalamic-pituitary-adrenal axis expression of habituation. *J Neuroendocrinol.* 2000; 12: 1034-42.
87. Colomer, C., Desarmenien, M. G. and Guerineau, N. C. Revisiting the stimulus-secretion coupling in the adrenal medulla: role of gap junction-mediated intercellular communication. *Mol Neurobiol.* 2009; 40: 87-100.
88. Colomer, C., Lafont, C. and Guerineau, N. C. Stress-induced intercellular communication remodeling in the rat adrenal medulla. *Ann N Y Acad Sci.* 2008a; 1148: 106-11.
89. Colomer, C., Martin, A. O., Desarmenien, M. G. and Guerineau, N. C. Gap junction-mediated intercellular communication in the adrenal medulla: an additional ingredient of stimulus-secretion coupling regulation. *Biochim Biophys Acta.* 2012; 1818: 1937-51.
90. Colomer, C., Olivos-Ore, L. A., Vincent, A., McIntosh, J. M., Artalejo, A. R. and Guerineau, N. C. Functional characterization of alpha9-containing cholinergic nicotinic receptors in the rat adrenal medulla: implication in stress-induced functional plasticity. *J Neurosci.* 2010; 30: 6732-42.
91. Colomer, C., Olivos Ore, L. A., Coutry, N., Mathieu, M. N., Arthaud, S., Fontanaud, P., Iankova, I., Macari, F., Thouennon, E., Yon, L., Anouar, Y. and Guerineau, N. C. Functional remodeling of gap junction-mediated electrical communication between adrenal chromaffin cells in stressed rats. *J Neurosci.* 2008b; 28: 6616-26.
92. Colquhoun, L. M. and Patrick, J. W. Pharmacology of neuronal nicotinic acetylcholine receptor subtypes. *Adv Pharmacol.* 1997; 39: 191-220.
93. Colledge, M. and Froehner, S. C. Signals mediating ion channel clustering at the neuromuscular junction. *Curr Opin Neurobiol.* 1998; 8: 357-63.
94. Conroy, W. G., Liu, Q. S., Nai, Q., Margiotta, J. F. and Berg, D. K. Potentiation of alpha7-containing nicotinic acetylcholine receptors by select albumins. *Mol Pharmacol.* 2003; 63: 419-28.
95. Conti-Tronconi, B. M., Dunn, S. M., Barnard, E. A., Dolly, J. O., Lai, F. A., Ray, N. and Raftery, M. A. Brain and muscle nicotinic acetylcholine receptors are different but homologous proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985; 82: 5208-12.
96. Cordero-Erausquin, M., Marubio, L. M., Klink, R. and Changeux, J. P. Nicotinic receptor function: new perspectives from knockout mice. *Trends Pharmacol Sci.* 2000; 21: 211-7.
97. Corringer, P. J., Le Novère, N. and Changeux, J. P. Nicotinic receptors at the amino acid level. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2000; 40: 431-58.
98. Costoli, T., Bartolomucci, A., Graiani, G., Stilli, D., Laviola, G. and Sgoifo, A. Effects of chronic psychosocial stress on cardiac autonomic responsiveness and myocardial structure in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004; 286: H2133-40.
99. Coupland, R. E. Electron microscopic observations on the structure of the rat adrenal medulla: II. Normal innervation. *J Anat.* 1965; 99: 255-72.
100. Coupland, R. E., Parker, T. L., Kesse, W. K. and Mohamed, A. A. The innervation of the adrenal gland. III. Vagal innervation. *J Anat.* 1989; 163: 173-81.
101. Coupland, R. E., Pyper, A. S. and Hopwood, D. A Method for Differentiating between Noradrenaline- and Adrenaline-Storing Cells in the Light and Electron Microscope. *Nature.* 1964; 201: 1240-2.
102. Couturier, S., Bertrand, D., Matter, J. M., Hernández, M. C., Bertrand, S., Millar, N., Valera, S., Barkas, T. and Ballivet, M. A neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit (alpha 7) is developmentally regulated and forms a homo-oligomeric channel blocked by alpha-BTX. *Neuron.* 1990; 5: 847-56.
103. Criado, M., Alamo, L. and Navarro, A. Primary structure of an agonist binding subunit of the nicotinic acetylcholine receptor from bovine adrenal chromaffin cells. *Neurochem Res.* 1992; 17: 281-7.
104. Criado, M., Domínguez del Toro, E., Carrasco-Serrano, C., Smillie, F. I., Juiz, J. M., Viniegra, S. and Ballesta, J. J. Differential expression of alpha-bungarotoxin-sensitive neuronal nicotinic receptors in adrenergic chromaffin cells: a role for transcription factor Egr-1. *J Neurosci.* 1997; 17: 6554-64.
105. Criado, M., Valor, L. M., Mulet, J., Gerber, S., Sala, S. and Sala, F. Expression and functional properties of alpha7 acetylcholine nicotinic receptors are modified in the presence of other receptor subunits. *J Neurochem.* 2012; 123: 504-14.
106. Croft, L., Schandorff, S., Clark, F., Burrage, K., Arctander, P. and Mattick, J. S. ISIS, the intron information system, reveals the high frequency of alternative splicing in the human genome. *Nat Genet.* 2000; 24: 340-1.

107. Cuevas, J., Roth, A. L. and Berg, D. K. Two distinct classes of functional 7-containing nicotinic receptor on rat superior cervical ganglion neurons. *J Physiol.* 2000; 525 Pt 3: 735-46.
108. Cull-Candy, S. G., Mathie, A. and Powis, D. A. Acetylcholine receptor channels and their block by clonidine in cultured bovine chromaffin cells. *J Physiol.* 1988; 402: 255-78.
109. Cullinan, W. E. GABA(A) receptor subunit expression within hypophysiotropic CRH neurons: a dual hybridization histochemical study. *J Comp Neurol.* 2000; 419: 344-51.
110. Cullinan, W. E., Herman, J. P. and Watson, S. J. Ventral subicular interaction with the hypothalamic paraventricular nucleus: evidence for a relay in the bed nucleus of the stria terminalis. *J Comp Neurol.* 1993; 332: 1-20.
111. Cunningham, E. T., Jr. and Sawchenko, P. E. Anatomical specificity of noradrenergic inputs to the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat hypothalamus. *J Comp Neurol.* 1988; 274: 60-76.
112. Curtis, L., Buisson, B., Bertrand, S. and Bertrand, D. Potentiation of human $\alpha 4 \beta 2$ neuronal nicotinic acetylcholine receptor by estradiol. *Mol Pharmacol.* 2002; 61: 127-35.
113. Champniaux, N., Gotti, C., Cordero-Erausquin, M., David, D. J., Przybylski, C., Lena, C., Clementi, F., Moretti, M., Rossi, F. M., Le Novère, N., McIntosh, J. M., Gardier, A. M. and Changeux, J. P. Subunit composition of functional nicotinic receptors in dopaminergic neurons investigated with knock-out mice. *J Neurosci.* 2003; 23: 7820-9.
114. Chan, S. A., Polo-Parada, L. and Smith, C. Action potential stimulation reveals an increased role for P/Q-calcium channel-dependent exocytosis in mouse adrenal tissue slices. *Arch Biochem Biophys.* 2005; 435: 65-73.
115. Chang, K. T. and Berg, D. K. Nicotinic acetylcholine receptors containing $\alpha 7$ subunits are required for reliable synaptic transmission in situ. *J Neurosci.* 1999; 19: 3701-10.
116. Changeux, J. and Edelstein, S. J. Allosteric mechanisms in normal and pathological nicotinic acetylcholine receptors. *Curr Opin Neurobiol.* 2001; 11: 369-77.
117. Chauvet, N., Prieto, M., Fabre, C., Noren, N. K. and Privat, A. Distribution of p120 catenin during rat brain development: potential role in regulation of cadherin-mediated adhesion and actin cytoskeleton organization. *Mol Cell Neurosci.* 2003; 22: 467-86.
118. Chernyavsky, A., Chen, Y., Wang, P. H. and Grando, S. A. Pemphigus vulgaris antibodies target the mitochondrial nicotinic acetylcholine receptors that protect keratinocytes from apoptosis. *Int Immunopharmacol.* 2015a
119. Chernyavsky, A. I., Arredondo, J., Vetter, D. E. and Grando, S. A. Central role of $\alpha 9$ acetylcholine receptor in coordinating keratinocyte adhesion and motility at the initiation of epithelialization. *Exp Cell Res.* 2007; 313: 3542-55.
120. Chernyavsky, A. I., Shchepotin, I. B., Galitovskiy, V. and Grando, S. A. Mechanisms of tumor-promoting activities of nicotine in lung cancer: synergistic effects of cell membrane and mitochondrial nicotinic acetylcholine receptors. *BMC Cancer.* 2015b; 15: 152.
121. Chiara, D. C., Xie, Y. and Cohen, J. B. Structure of the agonist-binding sites of the Torpedo nicotinic acetylcholine receptor: affinity-labeling and mutational analyses identify gamma Tyr-111/delta Arg-113 as antagonist affinity determinants. *Biochemistry.* 1999; 38: 6689-98.
122. Chiesa, N., Rosati, B., Arcangeli, A., Olivetto, M. and Wanke, E. A novel role for HERG K⁺ channels: spike-frequency adaptation. *J Physiol.* 1997; 501 (Pt 2): 313-8.
123. Chikova, A., Bernard, H. U., Shchepotin, I. B. and Grando, S. A. New associations of the genetic polymorphisms in nicotinic receptor genes with the risk of lung cancer. *Life Sci.* 2012;
124. Chikova, A. and Grando, S. A. Naturally occurring variants of human $\alpha 9$ nicotinic receptor differentially affect bronchial cell proliferation and transformation. *PLoS One.* 2011; 6: e27978.
125. Chow, R. H., von Ruden, L. and Neher, E. Delay in vesicle fusion revealed by electrochemical monitoring of single secretory events in adrenal chromaffin cells. *Nature.* 1992; 356: 60-3.
126. Christianson, J. C. and Green, W. N. Regulation of nicotinic receptor expression by the ubiquitin-proteasome system. *Embo J.* 2004; 23: 4156-65.
127. Dajas-Bailador, F. and Wonnacott, S. Nicotinic acetylcholine receptors and the regulation of neuronal signalling. *Trends Pharmacol Sci.* 2004; 25: 317-24.
128. De Vries, G. and Sherman, A. Channel sharing in pancreatic beta -cells revisited: enhancement of emergent bursting by noise. *J Theor Biol.* 2000; 207: 513-30.
129. Decker, E. R. and Dani, J. A. Calcium permeability of the nicotinic acetylcholine receptor: the single-channel calcium influx is significant. *J Neurosci.* 1990; 10: 3413-20.

130. Desarmenien, M. G., Jourdan, C., Toutain, B., Vessieres, E., Hormuzdi, S. G. and Guerineau, N. C. Gap junction signalling is a stress-regulated component of adrenal neuroendocrine stimulus-secretion coupling in vivo. *Nat Commun.* 2013; 4: 2938.
131. Dhabhar, F. S., McEwen, B. S. and Spencer, R. L. Adaptation to prolonged or repeated stress--comparison between rat strains showing intrinsic differences in reactivity to acute stress. *Neuroendocrinology.* 1997; 65: 360-8.
132. Di Angelantonio, S., Matteoni, C., Fabbretti, E. and Nistri, A. Molecular biology and electrophysiology of neuronal nicotinic receptors of rat chromaffin cells. *Eur J Neurosci.* 2003; 17: 2313-22.
133. Di Angelantonio, S., Nistri, A., Moretti, M., Clementi, F. and Gotti, C. Antagonism of nicotinic receptors of rat chromaffin cells by N,N, N-trimethyl-1-(4-trans-stilbenoxy)-2-propylammonium iodide: a patch clamp and ligand binding study. *Br J Pharmacol.* 2000; 129: 1771-9.
134. Di Cesare Mannelli, L., Cinci, L., Micheli, L., Zanardelli, M., Pacini, A., McIntosh, J. M. and Ghelardini, C. Alpha-conotoxin RgIA protects against the development of nerve injury-induced chronic pain and prevents both neuronal and glial derangement. *Pain.* 2014; 155: 1986-95.
135. Dineley, K. T. and Patrick, J. W. Amino acid determinants of alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor surface expression. *J Biol Chem.* 2000; 275: 13974-85.
136. Doroshenko, P. and Neher, E. Pertussis-toxin-sensitive inhibition by (-) baclofen of Ca signals in bovine chromaffin cells. *Pflugers Arch.* 1991; 419: 444-9.
137. Douglas, W. W. Stimulus-secretion coupling: the concept and clues from chromaffin and other cells. *Br J Pharmacol.* 1968; 34: 451-74.
138. Douglas, W. W., Kanno, T. and Sampson, S. R. Influence of the ionic environment on the membrane potential of adrenal chromaffin cells and on the depolarizing effect of acetylcholine. *J Physiol.* 1967; 191: 107-21.
139. Douglas, W. W. and Rubin, R. P. The role of calcium in the secretory response of the adrenal medulla to acetylcholine. *J Physiol.* 1961a; 159: 40-57.
140. Douglas, W. W. and Rubin, R. P. Mechanism of nicotinic action at the adrenal medulla: calcium as a link in stimulus-secretion coupling. *Nature.* 1961b; 192: 1087-9.
141. Duan, K., Yu, X., Zhang, C. and Zhou, Z. Control of secretion by temporal patterns of action potentials in adrenal chromaffin cells. *J Neurosci.* 2003; 23: 11235-43.
142. Duclert, A. and Changeux, J. P. Acetylcholine receptor gene expression at the developing neuromuscular junction. *Physiol Rev.* 1995; 75: 339-68.
143. Ducsay, C. A., Hyatt, K., Mlynarczyk, M., Root, B. K., Kaushal, K. M. and Myers, D. A. Long-term hypoxia modulates expression of key genes regulating adrenomedullary function in the late gestation ovine fetus. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2007; 293: R1997-2005.
144. Dumont, M., Day, R. and Lemaire, S. Distinct distribution of immunoreactive dynorphin and leucine enkephalin in various populations of isolated adrenal chromaffin cells. *Life Sci.* 1983; 32: 287-94.
145. Dun, N. J., Tang, H., Dun, S. L., Huang, R., Dun, E. C. and Wakade, A. R. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-immunoreactive sensory neurons innervate rat adrenal medulla. *Brain Res.* 1996; 716: 11-21.
146. Dunkley, P. R., Bobrovskaya, L., Graham, M. E., von Nagy-Felsobuki, E. I. and Dickson, P. W. Tyrosine hydroxylase phosphorylation: regulation and consequences. *J Neurochem.* 2004; 91: 1025-43.
147. Dursun, S. M., Reveley, M. A., Bird, R. and Stirton, F. Longlasting improvement of Tourette's syndrome with transdermal nicotine. *Lancet.* 1994; 344: 1577.
148. Dvorakova, M., Lips, K. S., Bruggmann, D., Slavikova, J., Kuncova, J. and Kummer, W. Developmental changes in the expression of nicotinic acetylcholine receptor alpha-subunits in the rat heart. *Cell Tissue Res.* 2005; 319: 201-9.
149. Dwyer, T. M., Adams, D. J. and Hille, B. The permeability of the endplate channel to organic cations in frog muscle. *J Gen Physiol.* 1980; 75: 469-92.
150. Eberhard, D. A. and Holz, R. W. Cholinergic stimulation of inositol phosphate formation in bovine adrenal chromaffin cells: distinct nicotinic and muscarinic mechanisms. *J Neurochem.* 1987; 49: 1634-43.
151. Eberhard, D. A. and Holz, R. W. Calcium promotes the accumulation of polyphosphoinositides in intact and permeabilized bovine adrenal chromaffin cells. *Cell Mol Neurobiol.* 1991; 11: 357-70.
152. Edwards, A. V. and Jones, C. T. Autonomic control of adrenal function. *J Anat.* 1993; 183 (Pt 2): 291-307.

153. Edwards, S. L., Anderson, C. R., Southwell, B. R. and McAllen, R. M. Distinct preganglionic neurons innervate noradrenaline and adrenaline cells in the cat adrenal medulla. *Neuroscience*. 1996; 70: 825-32.
154. Ehrhart-Bornstein, M., Hinson, J. P., Bornstein, S. R., Scherbaum, W. A. and Vinson, G. P. Intraadrenal interactions in the regulation of adrenocortical steroidogenesis. *Endocr Rev*. 1998; 19: 101-43.
155. El-Hajj, R. A., McKay, S. B. and McKay, D. B. Pharmacological and immunological identification of native alpha7 nicotinic receptors: evidence for homomeric and heteromeric alpha7 receptors. *Life Sci*. 2007; 81: 1317-22.
156. Elgoyhen, A. B., Johnson, D. S., Boulter, J., Vetter, D. E. and Heinemann, S. Alpha 9: an acetylcholine receptor with novel pharmacological properties expressed in rat cochlear hair cells. *Cell*. 1994; 79: 705-15.
157. Elgoyhen, A. B., Vetter, D. E., Katz, E., Rothlin, C. V., Heinemann, S. F. and Boulter, J. alpha10: a determinant of nicotinic cholinergic receptor function in mammalian vestibular and cochlear mechanosensory hair cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; 98: 3501-6.
158. Elhamdani, A., Palfrey, H. C. and Artalejo, C. R. Quantal size is dependent on stimulation frequency and calcium entry in calf chromaffin cells. *Neuron*. 2001; 31: 819-30.
159. Ellison, M., Feng, Z. P., Park, A. J., Zhang, X., Olivera, B. M., McIntosh, J. M. and Norton, R. S. Alpha-RgIA, a novel conotoxin that blocks the alpha9alpha10 nAChR: structure and identification of key receptor-binding residues. *J Mol Biol*. 2008; 377: 1216-27.
160. Ellison, M., Gao, F., Wang, H. L., Sine, S. M., McIntosh, J. M. and Olivera, B. M. Alpha-conotoxins ImI and ImII target distinct regions of the human alpha7 nicotinic acetylcholine receptor and distinguish human nicotinic receptor subtypes. *Biochemistry*. 2004; 43: 16019-26.
161. Ellison, M., Haberlandt, C., Gómez-Casati, M. E., Watkins, M., Elgoyhen, A. B., McIntosh, J. M. and Olivera, B. M. Alpha-RgIA: a novel conotoxin that specifically and potently blocks the alpha9alpha10 nAChR. *Biochemistry*. 2006; 45: 1511-7.
162. Enna, S. J. and Bowery, N. G. GABA(B) receptor alterations as indicators of physiological and pharmacological function. *Biochem Pharmacol*. 2004; 68: 1541-8.
163. Eranko, O. On the histochemistry of the adrenal medulla of the rat, with special reference to acid phosphatase. *Acta Anat (Basel)*. 1952; 3: 3-60.
164. Eranko, O. Histochemistry of noradrenaline in the adrenal medulla of rats and mice. *Endocrinology*. 1955; 57: 363-8.
165. Escalona, E., Sánchez-García, A. I., Álvarez, R., Rojo, J. and Gandia, L. Oxotremorina, un agonista de diferentes subtipos de receptores nicotínicos neuronales humanos. XXVII Reunión del Grupo Español de Neurotransmisión. 2006; 48.
166. Fambrough, D. M. Control of acetylcholine receptors in skeletal muscle. *Physiol Rev*. 1979; 59: 165-227.
167. Farah, V. M., Joaquim, L. F., Bernatova, I. and Morris, M. Acute and chronic stress influence blood pressure variability in mice. *Physiol Behav*. 2004; 83: 135-42.
168. Feldberg, W. and Vartiainen, A. Further observations on the physiology and pharmacology of a sympathetic ganglion. *J Physiol*. 1934; 83: 103-28.
169. Fenwick, E. M., Marty, A. and Neher, E. A patch-clamp study of bovine chromaffin cells and of their sensitivity to acetylcholine. *J Physiol*. 1982a; 331: 577-97.
170. Fenwick, E. M., Marty, A. and Neher, E. Sodium and calcium channels in bovine chromaffin cells. *J Physiol*. 1982b; 331: 599-635.
171. Fettiplace, R. and Hackney, C. M. The sensory and motor roles of auditory hair cells. *Nat Rev Neurosci*. 2006; 7: 19-29.
172. Ficklin, M. B., Zhao, S. and Feng, G. Ubiquitin-1 regulates nicotine-induced up-regulation of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *J Biol Chem*. 2005; 280: 34088-95.
173. Flatmark, T. Catecholamine biosynthesis and physiological regulation in neuroendocrine cells. *Acta Physiol Scand*. 2000; 168: 1-17.
174. Flora, A., Schulz, R., Benfante, R., Battaglioli, E., Terzano, S., Clementi, F. and Fornasari, D. Neuronal and extraneuronal expression and regulation of the human alpha5 nicotinic receptor subunit gene. *J Neurochem*. 2000; 75: 18-27.
175. Flores, C. M., Rogers, S. W., Pabreza, L. A., Wolfe, B. B. and Kellar, K. J. A subtype of nicotinic cholinergic receptor in rat brain is composed of alpha 4 and beta 2 subunits and is up-regulated by chronic nicotine treatment. *Mol Pharmacol*. 1992; 41: 31-7.

176. Franek, M., Vaculin, S. and Rokyta, R. GABA(B) receptor agonist baclofen has non-specific antinociceptive effect in the model of peripheral neuropathy in the rat. *Physiol Res.* 2004; 53: 351-5.
177. Frank, S. M., Higgins, M. S., Breslow, M. J., Fleisher, L. A., Gorman, R. B., Sitzmann, J. V., Raff, H. and Beattie, C. The catecholamine, cortisol, and hemodynamic responses to mild perioperative hypothermia. A randomized clinical trial. *Anesthesiology.* 1995; 82: 83-93.
178. Free, R. B., Bryant, D. L., McKay, S. B., Kaser, D. J. and McKay, D. B. [3H]Epibatidine binding to bovine adrenal medulla: evidence for alpha3beta4* nicotinic receptors. *Neurosci Lett.* 2002; 318: 98-102.
179. Free, R. B., McKay, S. B., Gottlieb, P. D., Boyd, R. T. and McKay, D. B. Expression of native alpha3beta4* neuronal nicotinic receptors: binding and functional studies investigating turnover of surface and intracellular receptor populations. *Mol Pharmacol.* 2005; 67: 2040-8.
180. Fucile, S. Ca²⁺ permeability of nicotinic acetylcholine receptors. *Cell Calcium.* 2004; 35: 1-8.
181. Fucile, S., Matter, J. M., Erkman, L., Ragozzino, D., Barabino, B., Grassi, F., Alema, S., Ballivet, M. and Eusebi, F. The neuronal alpha6 subunit forms functional heteromeric acetylcholine receptors in human transfected cells. *Eur J Neurosci.* 1998; 10: 172-8.
182. Fucile, S., Sucapane, A. and Eusebi, F. Ca²⁺ permeability through rat cloned alpha9-containing nicotinic acetylcholine receptors. *Cell Calcium.* 2006; 39: 349-55.
183. Fuchs, P. A. Synaptic transmission at vertebrate hair cells. *Curr Opin Neurobiol.* 1996; 6: 514-9.
184. Fuentealba, J., Olivares, R., Ales, E., Tapia, L., Rojo, J., Arroyo, G., Aldea, M., Criado, M., Gandía, L. and García, A. G. A choline-evoked [Ca²⁺]_i signal causes catecholamine release and hyperpolarization of chromaffin cells. *Faseb J.* 2004; 18: 1468-70.
185. Fukuhara, K., Kvetnansky, R., Cizza, G., Pacak, K., Ohara, H., Goldstein, D. S. and Kopin, I. J. Interrelations between sympathoadrenal system and hypothalamo-pituitary-adrenocortical/thyroid systems in rats exposed to cold stress. *J Neuroendocrinol.* 1996; 8: 533-41.
186. Fulop, T., Radabaugh, S. and Smith, C. Activity-dependent differential transmitter release in mouse adrenal chromaffin cells. *J Neurosci.* 2005; 25: 7324-32.
187. Fuller, R. W. Pharmacology of brain epinephrine neurons. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1982; 22: 31-55.
188. Gagner, J. P., Gauthier, S. and Sourkes, T. L. Descending spinal pathways mediating the responses of adrenal tyrosine hydroxylase and catecholamines to insulin and 2-deoxyglucose. *Brain Res.* 1985; 325: 187-97.
189. Gahring, L. C. and Rogers, S. W. Neuronal nicotinic acetylcholine receptor expression and function on nonneuronal cells. *Aaps J.* 2005; 7: E885-94.
190. Galvis, G., Lips, K. S. and Kummer, W. Expression of nicotinic acetylcholine receptors on murine alveolar macrophages. *J Mol Neurosci.* 2006; 30: 107-8.
191. Galzi, J. L., Bertrand, D., Devillers-Thiery, A., Revah, F., Bertrand, S. and Changeux, J. P. Functional significance of aromatic amino acids from three peptide loops of the alpha 7 neuronal nicotinic receptor site investigated by site-directed mutagenesis. *FEBS Lett.* 1991; 294: 198-202.
192. Galzi, J. L., Bertrand, S., Corringer, P. J., Changeux, J. P. and Bertrand, D. Identification of calcium binding sites that regulate potentiation of a neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *Embo J.* 1996; 15: 5824-32.
193. Galzi, J. L., Revah, F., Black, D., Goeldner, M., Hirth, C. and Changeux, J. P. Identification of a novel amino acid alpha-tyrosine 93 within the cholinergic ligands-binding sites of the acetylcholine receptor by photoaffinity labeling. Additional evidence for a three-loop model of the cholinergic ligands-binding sites. *J Biol Chem.* 1990; 265: 10430-7.
194. García-Guzmán, M., Sala, F., Sala, S., Campos-Caro, A., Stuhmer, W., Gutiérrez, L. M. and Criado, M. alpha-Bungarotoxin-sensitive nicotinic receptors on bovine chromaffin cells: molecular cloning, functional expression and alternative splicing of the alpha 7 subunit. *Eur J Neurosci.* 1995; 7: 647-55.
195. García, A. G., García-De-Diego, A. M., Gandía, L., Borges, R. and García-Sancho, J. Calcium signaling and exocytosis in adrenal chromaffin cells. *Physiol Rev.* 2006; 86: 1093-131.
196. Gault, J., Hopkins, J., Berger, R., Drebing, C., Logel, J., Walton, C., Short, M., Vianzon, R., Olincy, A., Ross, R. G., Adler, L. E., Freedman, R. and Leonard, S. Comparison of polymorphisms in the alpha7 nicotinic receptor gene and its partial duplication in schizophrenic and control subjects. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2003; 123B: 39-49.
197. Gault, J., Robinson, M., Berger, R., Drebing, C., Logel, J., Hopkins, J., Moore, T., Jacobs, S., Meriwether, J., Choi, M. J., Kim, E. J., Walton, K., Buiting, K., Davis, A., Breese, C., Freedman, R. and

- Leonard, S. Genomic organization and partial duplication of the human $\alpha 7$ neuronal nicotinic acetylcholine receptor gene (CHRNA7). *Genomics*. 1998; 52: 173-85.
198. Genzen, J. R., Van Cleve, W. and McGehee, D. S. Dorsal root ganglion neurons express multiple nicotinic acetylcholine receptor subtypes. *J Neurophysiol*. 2001; 86: 1773-82.
199. Gerzanich, V., Wang, F., Kuryatov, A. and Lindstrom, J. $\alpha 5$ Subunit alters desensitization, pharmacology, Ca^{++} permeability and Ca^{++} modulation of human neuronal $\alpha 3$ nicotinic receptors. *J Pharmacol Exp Ther*. 1998; 286: 311-20.
200. Gancippoli, A., Novara, M., de Luca, A., Baldelli, P., Marcantoni, A., Carbone, E. and Carabelli, V. Low-threshold exocytosis induced by cAMP-recruited $\text{CaV}3.2$ ($\alpha 1\text{H}$) channels in rat chromaffin cells. *Biophys J*. 2006; 90: 1830-41.
201. Gillies, G. E., Linton, E. A. and Lowry, P. J. Corticotropin releasing activity of the new CRF is potentiated several times by vasopressin. *Nature*. 1982; 299: 355-7.
202. Girod, R., Crabtree, G., Ernstom, G., Ramirez-Latorre, J., McGehee, D., Turner, J. and Role, L. Heteromeric complexes of $\alpha 5$ and/or $\alpha 7$ subunits. Effects of calcium and potential role in nicotine-induced presynaptic facilitation. *Ann N Y Acad Sci*. 1999; 868: 578-90.
203. Glavinovic, M. I. and Trifaro, J. M. Quinine blockade of currents through Ca^{2+} -activated K^{+} channels in bovine chromaffin cells. *J Physiol*. 1988; 399: 139-52.
204. Goldner, F. M., Dineley, K. T. and Patrick, J. W. Immunohistochemical localization of the nicotinic acetylcholine receptor subunit $\alpha 6$ to dopaminergic neurons in the substantia nigra and ventral tegmental area. *Neuroreport*. 1997; 8: 2739-42.
205. Goldstein, C. G. Stress, CA and cardiovascular disease. *Oxford Univ.* . 1995; 539.
206. Goldstein, D. S. Catecholamines and stress. *Endocr Regul*. 2003; 37: 69-80.
207. Goldstein, D. S. and Kopin, I. J. Evolution of concepts of stress. *Stress*. 2007; 10: 109-20.
208. Goldstein, D. S. and Kopin, I. J. Adrenomedullary, adrenocortical, and sympathoneural responses to stressors: a meta-analysis. *Endocr Regul*. 2008; 42: 111-9.
209. Goldstein, D. S. and McEwen, B. Allostasis, homeostats, and the nature of stress. *Stress*. 2002; 5: 55-8.
210. Goldstein, M., Fuxe, K., Hokfelt, T. and Joh, T. H. Immunohistochemical studies on phenylethanolamine-N-methyltransferase, dopa-decarboxylase and dopamine- β -hydroxylase. *Experientia*. 1971; 27: 951-2.
211. Gómez-Casati, M. E., Fuchs, P. A., Elgoyhen, A. B. and Katz, E. Biophysical and pharmacological characterization of nicotinic cholinergic receptors in rat cochlear inner hair cells. *J Physiol*. 2005; 566: 103-18.
212. González-García, C., Cena, V., Keiser, H. R. and Rojas, E. Catecholamine secretion induced by tetraethylammonium from cultured bovine adrenal chromaffin cells. *Biochim Biophys Acta*. 1993; 1177: 99-105.
213. Gotti, C. and Clementi, F. Neuronal nicotinic receptors: from structure to pathology. *Prog Neurobiol*. 2004; 74: 363-96.
214. Gotti, C., Fornasari, D. and Clementi, F. Human neuronal nicotinic receptors. *Prog Neurobiol*. 1997; 53: 199-237.
215. Gotti, C., Moretti, M., Zanardi, A., Gaimarri, A., Champiaux, N., Changeux, J. P., Whiteaker, P., Marks, M. J., Clementi, F. and Zoli, M. Heterogeneity and selective targeting of neuronal nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) subtypes expressed on retinal afferents of the superior colliculus and lateral geniculate nucleus: identification of a new native nAChR subtype $\alpha 3\beta 2(\alpha 5 \text{ or } \beta 3)$ enriched in retinocollicular afferents. *Mol Pharmacol*. 2005; 68: 1162-71.
216. Gotti, C., Zoli, M. and Clementi, F. Brain nicotinic acetylcholine receptors: native subtypes and their relevance. *Trends Pharmacol Sci*. 2006; 27: 482-91.
217. Grady, S., Marks, M. J., Wonnacott, S. and Collins, A. C. Characterization of nicotinic receptor-mediated $[^3\text{H}]$ dopamine release from synaptosomes prepared from mouse striatum. *J Neurochem*. 1992; 59: 848-56.
218. Gray, R., Rajan, A. S., Radcliffe, K. A., Yakehiro, M. and Dani, J. A. Hippocampal synaptic transmission enhanced by low concentrations of nicotine. *Nature*. 1996; 383: 713-6.
219. Grinevich, V. P., Letchworth, S. R., Lindenberger, K. A., Menager, J., Mary, V., Sadieva, K. A., Buhlman, L. M., Bohme, G. A., Pradier, L., Benavides, J., Lukas, R. J. and Bencherif, M. Heterologous expression of human $\alpha 6\beta 4\beta 3\alpha 5$ nicotinic acetylcholine receptors: binding

- properties consistent with their natural expression require quaternary subunit assembly including the {alpha}5 subunit. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005; 312: 619-26.
220. Grippo, A. J., Moffitt, J. A. and Johnson, A. K. Cardiovascular alterations and autonomic imbalance in an experimental model of depression. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2002; 282: R1333-41.
 221. Grynszpan-Winograd, O. Adrenaline and noradrenaline cells in the adrenal medulla of the hamster: a morphological study of their innervation. *J Neurocytol.* 1974; 3: 341-61.
 222. Grynszpan-Wynograd, O. and Nicolas, G. Intercellular junctions in the adrenal medulla: a comparative freeze-fracture study. *Tissue Cell.* 1980; 12: 661-72.
 223. Gu, H., Wenger, B. W., López, I., McKay, S. B., Boyd, R. T. and McKay, D. B. Characterization and localization of adrenal nicotinic acetylcholine receptors: evidence that mAb35-nicotinic receptors are the principal receptors mediating adrenal catecholamine secretion. *J Neurochem.* 1996; 66: 1454-61.
 224. Guerineau, N. C. and Desarmenien, M. G. Developmental and stress-induced remodeling of cell-cell communication in the adrenal medullary tissue. *Cell Mol Neurobiol.* 2010; 30: 1425-31.
 225. Guerineau, N. C., Desarmenien, M. G., Carabelli, V. and Carbone, E. Functional Chromaffin Cell Plasticity in Response to Stress: Focus on Nicotinic, Gap Junction, and Voltage-Gated Ca(2+) Channels. *J Mol Neurosci.* 2012.
 226. Gullo, F., Ales, E., Rosati, B., Lecchi, M., Masi, A., Guasti, L., Cano-Abad, M. F., Arcangeli, A., López, M. G. and Wanke, E. ERG K⁺ channel blockade enhances firing and epinephrine secretion in rat chromaffin cells: the missing link to LQT2-related sudden death? *Faseb J.* 2003; 17: 330-2.
 227. Guzmán, J. N., Hernández, A., Galarraga, E., Tapia, D., Laville, A., Vergara, R., Aceves, J. and Bargas, J. Dopaminergic modulation of axon collaterals interconnecting spiny neurons of the rat striatum. *J Neurosci.* 2003; 23: 8931-40.
 228. Haberberger, R. V., Bernardini, N., Kress, M., Hartmann, P., Lips, K. S. and Kummer, W. Nicotinic acetylcholine receptor subtypes in nociceptive dorsal root ganglion neurons of the adult rat. *Auton Neurosci.* 2004; 113: 32-42.
 229. Hajos, M., Hurst, R. S., Hoffmann, W. E., Krause, M., Wall, T. M., Higdon, N. R. and Groppi, V. E. The selective alpha7 nicotinic acetylcholine receptor agonist PNU-282987 [N-[(3R)-1-Azabicyclo[2.2.2]oct-3-yl]-4-chlorobenzamide hydrochloride] enhances GABAergic synaptic activity in brain slices and restores auditory gating deficits in anesthetized rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005; 312: 1213-22.
 230. Halevi, S., Yassin, L., Eshel, M., Sala, F., Sala, S., Criado, M. and Treinin, M. Conservation within the RIC-3 gene family. Effectors of mammalian nicotinic acetylcholine receptor expression. *J Biol Chem.* 2003; 278: 34411-7.
 231. Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B. and Sigworth, F. J. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch.* 1981; 391: 85-100.
 232. Han, Z. Y., Le Novère, N., Zoli, M., Hill, J. A., Jr., Champtiaux, N. and Changeux, J. P. Localization of nAChR subunit mRNAs in the brain of *Macaca mulatta*. *Eur J Neurosci.* 2000; 12: 3664-74.
 233. Hanse, E. and Gustafsson, B. Quantal variability at glutamatergic synapses in area CA1 of the rat neonatal hippocampus. *J Physiol.* 2001; 531: 467-80.
 234. Hansen, S. B., Sulzenbacher, G., Huxford, T., Marchot, P., Taylor, P. and Bourne, Y. Structures of *Aplysia* AChBP complexes with nicotinic agonists and antagonists reveal distinctive binding interfaces and conformations. *Embo J.* 2005; 24: 3635-46.
 235. Harbuz, M. S. and Lightman, S. L. Responses of hypothalamic and pituitary mRNA to physical and psychological stress in the rat. *J Endocrinol.* 1989; 122: 705-11.
 236. Harkness, P. C. and Millar, N. S. Changes in conformation and subcellular distribution of alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptors revealed by chronic nicotine treatment and expression of subunit chimeras. *J Neurosci.* 2002; 22: 10172-81.
 237. Heeschen, C., Jang, J. J., Weis, M., Pathak, A., Kaji, S., Hu, R. S., Tsao, P. S., Johnson, F. L. and Cooke, J. P. Nicotine stimulates angiogenesis and promotes tumor growth and atherosclerosis. *Nat Med.* 2001; 7: 833-9.
 238. Herman, J. P., Adams, D. and Prewitt, C. Regulatory changes in neuroendocrine stress-integrative circuitry produced by a variable stress paradigm. *Neuroendocrinology.* 1995; 61: 180-90.

239. Hernandez-Vivanco, A., Hone, A. J., Scadden, M. L., Carmona-Hidalgo, B., McIntosh, J. M. and Albillos, A. Monkey adrenal chromaffin cells express alpha6beta4* nicotinic acetylcholine receptors. *PLoS One*. 2014; 9: e94142.
240. Herzog, R. I., Cummins, T. R., Ghassemi, F., Dib-Hajj, S. D. and Waxman, S. G. Distinct repriming and closed-state inactivation kinetics of Nav1.6 and Nav1.7 sodium channels in mouse spinal sensory neurons. *J Physiol*. 2003; 551: 741-50.
241. Hiel, H., Luebke, A. E. and Fuchs, P. A. Cloning and expression of the alpha9 nicotinic acetylcholine receptor subunit in cochlear hair cells of the chick. *Brain Res*. 2000; 858: 215-25.
242. Hilf, R. J. and Dutzler, R. X-ray structure of a prokaryotic pentameric ligand-gated ion channel. *Nature*. 2008; 452: 375-9.
243. Hill, J., Chan, S. A., Kuri, B. and Smith, C. Pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP) recruits low voltage-activated T-type calcium influx under acute sympathetic stimulation in mouse adrenal chromaffin cells. *J Biol Chem*. 2011; 286: 42459-69.
244. Hill, J., Lee, S. K., Samasilp, P. and Smith, C. Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Peptide (PACAP) Enhances Electrical Coupling in the Mouse Adrenal Medulla. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2012;
245. Hodgkin, A. L. and Huxley, A. F. The components of membrane conductance in the giant axon of *Loligo*. *J Physiol*. 1952; 116: 473-96.
246. Hodgkin, A. L., Huxley, A. F. and Katz, B. Measurement of current-voltage relations in the membrane of the giant axon of *Loligo*. *J Physiol*. 1952; 116: 424-48.
247. Hogg, R. C., Raggenbass, M. and Bertrand, D. Nicotinic acetylcholine receptors: from structure to brain function. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*. 2003; 147: 1-46.
248. Holets, V. and Elde, R. The differential distribution and relationship of serotonergic and peptidergic fibers to sympathoadrenal neurons in the intermediolateral cell column of the rat: a combined retrograde axonal transport and immunofluorescence study. *Neuroscience*. 1982; 7: 1155-74.
249. Holman, M. E., Coleman, H. A., Tonta, M. A. and Parkinson, H. C. Synaptic transmission from splanchnic nerves to the adrenal medulla of guinea-pigs. *J Physiol*. 1994; 478 (Pt 1): 115-24.
250. Holman, M. E., Tonta, M. A., Coleman, H. A. and Parkinson, H. C. Currents caused by the spontaneous release of quanta of acetylcholine onto chromaffin cells in guinea-pig adrenal medulla. *Neurosci Lett*. 1995; 184: 75-8.
251. Holmes, P. V., Blanchard, D. C., Blanchard, R. J., Brady, L. S. and Crawley, J. N. Chronic social stress increases levels of preprogalanin mRNA in the rat locus coeruleus. *Pharmacol Biochem Behav*. 1995; 50: 655-60.
252. Holtman, J. R., Dwoskin, L. P., Dowell, C., Wala, E. P., Zhang, Z., Crooks, P. A. and McIntosh, J. M. The novel small molecule alpha9alpha10 nicotinic acetylcholine receptor antagonist ZZ-204G is analgesic. *Eur J Pharmacol*. 2011; 670: 500-8.
253. Hollins, B. and Ikeda, S. R. Inward currents underlying action potentials in rat adrenal chromaffin cells. *J Neurophysiol*. 1996; 76: 1195-211.
254. Hone, A. J., Meyer, E. L., McIntyre, M. and McIntosh, J. M. Nicotinic acetylcholine receptors in dorsal root ganglion neurons include the alpha6beta4* subtype. *FASEB J*. 2012; 26: 917-26.
255. Horn, R. and Marty, A. Muscarinic activation of ionic currents measured by a new whole-cell recording method. *J Gen Physiol*. 1988; 92: 145-59.
256. Hoyle, E., Genn, R. F., Fernandes, C. and Stolerman, I. P. Impaired performance of alpha7 nicotinic receptor knockout mice in the five-choice serial reaction time task. *Psychopharmacology (Berl)*. 2006; 189: 211-23.
257. Huang, M. H., Bahl, J. J., Wu, Y., Hu, F., Larson, D. F., Roeske, W. R. and Ewy, G. A. Neuroendocrine properties of intrinsic cardiac adrenergic cells in fetal rat heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005; 288: H497-503.
258. Huang, M. H., Friend, D. S., Sunday, M. E., Singh, K., Haley, K., Austen, K. F., Kelly, R. A. and Smith, T. W. An intrinsic adrenergic system in mammalian heart. *J Clin Invest*. 1996; 98: 1298-1303.
259. Hurley, K. M., Herbert, H., Moga, M. M. and Saper, C. B. Efferent projections of the infralimbic cortex of the rat. *J Comp Neurol*. 1991; 308: 249-76.
260. Hurst, R. S., Hajos, M., Raggenbass, M., Wall, T. M., Higdon, N. R., Lawson, J. A., Rutherford-Root, K. L., Berkenpas, M. B., Hoffmann, W. E., Piotrowski, D. W., Groppi, V. E., Allaman, G., Ogier, R., Bertrand, S., Bertrand, D. and Arneric, S. P. A novel positive allosteric modulator of the alpha7 neuronal nicotinic acetylcholine receptor: in vitro and in vivo characterization. *J Neurosci*. 2005; 25: 4396-405.

261. Igusa, Y. Adenosine 5'-triphosphate activates acetylcholine receptor channels in cultured *Xenopus* myotomal muscle cells. *J Physiol.* 1988; 405: 169-85.
262. Iijima, T., Matsumoto, G. and Kidokoro, Y. Synaptic activation of rat adrenal medulla examined with a large photodiode array in combination with a voltage-sensitive dye. *Neuroscience.* 1992; 51: 211-9.
263. Imoto, K., Busch, C., Sakmann, B., Mishina, M., Konno, T., Nakai, J., Bujo, H., Mori, Y., Fukuda, K. and Numa, S. Rings of negatively charged amino acids determine the acetylcholine receptor channel conductance. *Nature.* 1988; 335: 645-8.
264. Imoto, K., Konno, T., Nakai, J., Wang, F., Mishina, M. and Numa, S. A ring of uncharged polar amino acids as a component of channel constriction in the nicotinic acetylcholine receptor. *FEBS Lett.* 1991; 289: 193-200.
265. Imoto, K., Methfessel, C., Sakmann, B., Mishina, M., Mori, Y., Konno, T., Fukuda, K., Kurasaki, M., Bujo, H., Fujita, Y. and et al. Location of a delta-subunit region determining ion transport through the acetylcholine receptor channel. *Nature.* 1986; 324: 670-4.
266. Indurthi, D. C., Pera, E., Kim, H. L., Chu, C., McLeod, M. D., McIntosh, J. M., Absalom, N. L. and Chebib, M. Presence of multiple binding sites on $\alpha 9\alpha 10$ nAChR receptors alludes to stoichiometric-dependent action of the α -conotoxin, Vc1.1. *Biochem Pharmacol.* 2014; 89: 131-40.
267. Inoue, M., Harada, K., Matsuoka, H., Nakamura, J. and Warashina, A. Mechanisms and roles of muscarinic activation in guinea-pig adrenal medullary cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2012; 303: C635-44.
268. Inoue, M. and Imanaga, I. G protein-mediated inhibition of inwardly rectifying K^+ channels in guinea pig chromaffin cells. *Am J Physiol.* 1993; 265: C946-56.
269. Inoue, M. and Kuriyama, H. Properties of the nicotinic-receptor-activated current in adrenal chromaffin cells of the guinea-pig. *Pflugers Arch.* 1991; 419: 13-20.
270. Ishikawa, K., Kakegawa, T. and Suzuki, M. Role of the hypothalamic paraventricular nucleus in the secretion of thyrotropin under adrenergic and cold-stimulated conditions in the rat. *Endocrinology.* 1984; 114: 352-8.
271. Ishikawa, K. and Kanno, T. Influences of extracellular calcium and potassium concentrations on adrenaline release and membrane potential in the perfused adrenal medulla of the rat. *Jpn J Physiol.* 1978; 28: 275-89.
272. Iversen, L. Neurotransmitter transporters: fruitful targets for CNS drug discovery. *Mol Psychiatry.* 2000; 5: 357-62.
273. Jagger, D. J., Griesinger, C. B., Rivolta, M. N., Holley, M. C. and Ashmore, J. F. Calcium signalling mediated by the $\alpha 9$ acetylcholine receptor in a cochlear cell line from the Immortomouse. *J Physiol.* 2000; 527: 49-54.
274. Jedema, H. P., Finlay, J. M., Sved, A. F. and Grace, A. A. Chronic cold exposure potentiates CRH-evoked increases in electrophysiologic activity of locus coeruleus neurons. *Biol Psychiatry.* 2001; 49: 351-9.
275. Jensen, A. A., Frolund, B., Liljefors, T. and Krosgaard-Larsen, P. Neuronal nicotinic acetylcholine receptors: structural revelations, target identifications, and therapeutic inspirations. *J Med Chem.* 2005; 48: 4705-45.
276. Johnson, D. S., Martínez, J., Elgoyhen, A. B., Heinemann, S. F. and McIntosh, J. M. α -Conotoxin Iml exhibits subtype-specific nicotinic acetylcholine receptor blockade: preferential inhibition of homomeric $\alpha 7$ and $\alpha 9$ receptors. *Mol Pharmacol.* 1995; 48: 194-9.
277. Jones, I. W. and Wonnacott, S. Precise localization of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors on glutamatergic axon terminals in the rat ventral tegmental area. *J Neurosci.* 2004; 24: 11244-52.
278. Jones, S., Sudweeks, S. and Yakel, J. L. Nicotinic receptors in the brain: correlating physiology with function. *Trends Neurosci.* 1999; 22: 555-61.
279. Kaiser, S. A., Soliakov, L., Harvey, S. C., Luetje, C. W. and Wonnacott, S. Differential inhibition by α -conotoxin-MII of the nicotinic stimulation of $[^3H]$ dopamine release from rat striatal synaptosomes and slices. *J Neurochem.* 1998; 70: 1069-76.
280. Kajiwara, R., Sand, O., Kidokoro, Y., Barish, M. E. and Iijima, T. Functional organization of chromaffin cells and cholinergic synaptic transmission in rat adrenal medulla. *Jpn J Physiol.* 1997; 47: 449-64.
281. Kalamida, D., Poulas, K., Avramopoulou, V., Fostieri, E., Lagoumintzis, G., Lazaridis, K., Sideri, A., Zouridakis, M. and Tzartos, S. J. Muscle and neuronal nicotinic acetylcholine receptors. Structure, function and pathogenicity. *Febs J.* 2007; 274: 3799-845.

282. Kanosue, K., Hosono, T., Zhang, Y. H. and Chen, X. M. Neuronal networks controlling thermoregulatory effectors. Brain function in hot environment. 1998; 115: 49-62.
283. Kanosue, K., Nakayama, T., Tanaka, H., Yanase, M. and Yasuda, H. Modes of action of local hypothalamic and skin thermal stimulation on salivary secretion in rats. J Physiol. 1990; 424: 459-71.
284. Karadsheh, M. S., Shah, M. S., Tang, X., Macdonald, R. L. and Stitzel, J. A. Functional characterization of mouse alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptors stably expressed in HEK293T cells. J Neurochem. 2004; 91: 1138-50.
285. Karlin, A. Emerging structure of the nicotinic acetylcholine receptors. Nat Rev Neurosci. 2002; 3: 102-14.
286. Kato, K., Nakagawa, C., Murabayashi, H. and Oomori, Y. Expression and distribution of GABA and GABAB-receptor in the rat adrenal gland. J Anat. 2014; 224: 207-15.
287. Katz, E., Elgoyhen, A. B., Gómez-Casati, M. E., Knipper, M., Vetter, D. E., Fuchs, P. A. and Glowatzki, E. Developmental regulation of nicotinic synapses on cochlear inner hair cells. J Neurosci. 2004; 24: 7814-20.
288. Katz, E., Verbitsky, M., Rothlin, C. V., Vetter, D. E., Heinemann, S. F. and Elgoyhen, A. B. High calcium permeability and calcium block of the alpha9 nicotinic acetylcholine receptor. Hear Res. 2000; 141: 117-28.
289. Kaufman, S. Tyrosine hydroxylase. Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol. 1995; 70: 103-220.
290. Kawashima, K. and Fujii, T. Extraneuronal cholinergic system in lymphocytes. Pharmacol Ther. 2000; 86: 29-48.
291. Kawata, M., Yuri, K. and Morimoto, M. Steroid hormone effects on gene expression, neuronal structure, and differentiation. Horm Behav. 1994; 28: 477-82.
292. Kayano, T., Noda, M., Flockerzi, V., Takahashi, H. and Numa, S. Primary structure of rat brain sodium channel III deduced from the cDNA sequence. FEBS Lett. 1988; 228: 187-94.
293. Keiger, C. J. and Walker, J. C. Individual variation in the expression profiles of nicotinic receptors in the olfactory bulb and trigeminal ganglion and identification of alpha2, alpha6, alpha9, and beta3 transcripts. Biochem Pharmacol. 2000; 59: 233-40.
294. Kennedy, B., Elayan, H. and Ziegler, M. G. Glucocorticoid induction of epinephrine synthesizing enzyme in rat skeletal muscle and insulin resistance. J Clin Invest. 1993; 92: 303-7.
295. Khiroug, L., Giniatullin, R., Sokolova, E., Talantova, M. and Nistri, A. Imaging of intracellular calcium during desensitization of nicotinic acetylcholine receptors of rat chromaffin cells. Br J Pharmacol. 1997; 122: 1323-32.
296. Khiroug, S. S., Harkness, P. C., Lamb, P. W., Sudweeks, S. N., Khiroug, L., Millar, N. S. and Yakel, J. L. Rat nicotinic ACh receptor alpha7 and beta2 subunits co-assemble to form functional heteromeric nicotinic receptor channels. J Physiol. 2002; 540: 425-34.
297. Kidokoro, Y. [Formation of neuromuscular junction, with special reference to acetylcholine receptor accumulation]. Tanpakushitsu Kakusan Koso. 1983; 28: 521-30.
298. Kidokoro, Y. and Ritchie, A. K. Chromaffin cell action potentials and their possible role in adrenaline secretion from rat adrenal medulla. J Physiol. 1980; 307: 199-216.
299. Kilpatrick, D. L., Slepatis, R. and Kirshner, N. Ion channels and membrane potential in stimulus-secretion coupling in adrenal medulla cells. J Neurochem. 1981; 36: 1245-55.
300. Kiyohara, T., Miyata, S., Nakamura, T., Shido, O., Nakashima, T. and Shibata, M. Differences in Fos expression in the rat brains between cold and warm ambient exposures. Brain Res Bull. 1995; 38: 193-201.
301. Klevans, L. R. and Gebber, G. L. Comparison of differential secretion of adrenal catecholamines by splanchnic nerve stimulation and cholinergic agents. J Pharmacol Exp Ther. 1970; 172: 69-76.
302. Klimis, H., Adams, D. J., Callaghan, B., Nevin, S., Alewood, P. F., Vaughan, C. W., Mozar, C. A. and Christie, M. J. A novel mechanism of inhibition of high-voltage activated calcium channels by alpha-conotoxins contributes to relief of nerve injury-induced neuropathic pain. Pain. 2011; 152: 259-66.
303. Klink, R., de Kerchove d'Exaerde, A., Zoli, M. and Changeux, J. P. Molecular and physiological diversity of nicotinic acetylcholine receptors in the midbrain dopaminergic nuclei. J Neurosci. 2001; 21: 1452-63.
304. Klugbauer, N., Lacinova, L., Flockerzi, V. and Hofmann, F. Structure and functional expression of a new member of the tetrodotoxin-sensitive voltage-activated sodium channel family from human neuroendocrine cells. EMBO J. 1995; 14: 1084-90.

-
305. Knaus, H. G., McManus, O. B., Lee, S. H., Schmalhofer, W. A., García-Calvo, M., Helms, L. M., Sánchez, M., Giangiacomo, K., Reuben, J. P., Smith, A. B., 3rd and et al. Tremorgenic indole alkaloids potently inhibit smooth muscle high-conductance calcium-activated potassium channels. *Biochemistry*. 1994; 33: 5819-28.
306. Konno, T., Busch, C., Von Kitzing, E., Imoto, K., Wang, F., Nakai, J., Mishina, M., Numa, S. and Sakmann, B. Rings of anionic amino acids as structural determinants of ion selectivity in the acetylcholine receptor channel. *Proc Biol Sci*. 1991; 244: 69-79.
307. Kopp, N., Denoroy, L., Renaud, B., Pujol, J. F., Tabib, A. and Tommasi, M. Distribution of adrenaline-synthesizing enzyme activity in the human brain. *J Neurol Sci*. 1979; 41: 397-409.
308. Krause, R. M., Buisson, B., Bertrand, S., Corringer, P. J., Galzi, J. L., Changeux, J. P. and Bertrand, D. Ivermectin: a positive allosteric effector of the $\alpha 7$ neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *Mol Pharmacol*. 1998; 53: 283-94.
309. Kubovcakova, L., Micutkova, L., Bartosova, Z., Sabban, E. L., Krizanova, O. and Kvetnansky, R. Identification of phenylethanolamine N-methyltransferase gene expression in stellate ganglia and its modulation by stress. *J Neurochem*. 2006; 97: 1419-30.
310. Kumar, P. and Meizel, S. Nicotinic acetylcholine receptor subunits and associated proteins in human sperm. *J Biol Chem*. 2005; 280: 25928-35.
311. Kumer, S. C. and Vrana, K. E. Intricate regulation of tyrosine hydroxylase activity and gene expression. *J Neurochem*. 1996; 67: 443-62.
312. Kuri, B. A., Chan, S. A. and Smith, C. B. PACAP regulates immediate catecholamine release from adrenal chromaffin cells in an activity-dependent manner through a protein kinase C-dependent pathway. *J Neurochem*. 2009; 110: 1214-25.
313. Kuryatov, A., Onksen, J. and Lindstrom, J. Roles of accessory subunits in $\alpha 4\beta 2(*)$ nicotinic receptors. *Mol Pharmacol*. 2008; 74: 132-43.
314. Kurzen, H., Berger, H., Jager, C., Hartschuh, W., Naher, H., Gratchev, A., Goerdts, S. and Deichmann, M. Phenotypical and molecular profiling of the extraneuronal cholinergic system of the skin. *J Invest Dermatol*. 2004; 123: 937-49.
315. Kvetnansky, R., Gewirtz, G. P., Weise, V. K. and Kopin, I. J. Catecholamine-synthesizing enzymes in the rat adrenal gland during exposure to cold. *Am J Physiol*. 1971; 220: 928-31.
316. Kvetnansky, R., Jelokova, J., Rusnak, M., Dronjak, S., Serova, L., Nankova, B. and Sabban, E. Novel stressors exaggerate tyrosine hydroxylase gene expression in the adrenal medulla of rats exposed to long-term cold stress. *Stress Neural, Endocrine and Molecular Studies*. 2002; 121-128.
317. Kvetnansky, R., Kubovcakova, L., Tillinger, A., Micutkova, L., Krizanova, O. and Sabban, E. L. Gene expression of phenylethanolamine N-methyltransferase in corticotropin-releasing hormone knockout mice during stress exposure. *Cell Mol Neurobiol*. 2006; 26: 735-54.
318. Kvetnansky, R., Micutkova, L., Rychkova, N., Kubovcakova, L., Mravec, B., Filipenko, M., Sabban, E. L. and Krizanova, O. Quantitative evaluation of catecholamine enzymes gene expression in adrenal medulla and sympathetic Ganglia of stressed rats. *Ann N Y Acad Sci*. 2004; 1018: 356-69.
319. Kvetnansky, R., Pacak, K., Sabban, E. L., Kopin, I. J. and Goldstein, D. S. Stressor specificity of peripheral catecholaminergic activation. *Adv Pharmacol*. 1998; 42: 556-60.
320. Kvetnansky, R., Sabban, E. L. and Palkovits, M. Catecholaminergic systems in stress: structural and molecular genetic approaches. *Physiol Rev*. 2009; 89: 535-606.
321. Kvetnansky, R., Sun, C. L., Lake, C. R., Thoa, N., Torda, T. and Kopin, I. J. Effect of handling and forced immobilization on rat plasma levels of epinephrine, norepinephrine, and dopamine-beta-hydroxylase. *Endocrinology*. 1978; 103: 1868-74.
322. Langley, J. N. On the contraction of muscle, chiefly in relation to the presence of "receptive" substances: Part I. *J Physiol*. 1907; 36: 347-84.
323. Lansdell, S. J., Collins, T., Yabe, A., Gee, V. J., Gibb, A. J. and Millar, N. S. Host-cell specific effects of the nicotinic acetylcholine receptor chaperone RIC-3 revealed by a comparison of human and *Drosophila* RIC-3 homologues. *J Neurochem*. 2008; 105: 1573-81.
324. Le Novère, N., Zoli, M. and Changeux, J. P. Neuronal nicotinic receptor $\alpha 6$ subunit mRNA is selectively concentrated in catecholaminergic nuclei of the rat brain. *Eur J Neurosci*. 1996; 8: 2428-39.
325. Lee, C. H., Chang, Y. C., Chen, C. S., Tu, S. H., Wang, Y. J., Chen, L. C., Chang, Y. J., Wei, P. L., Chang, H. W., Chang, C. H., Huang, C. S., Wu, C. H. and Ho, Y. S. Crosstalk between nicotine and
-

- estrogen-induced estrogen receptor activation induces alpha9-nicotinic acetylcholine receptor expression in human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat.* 2011; 129: 331-45.
326. Lee, C. H., Huang, C. S., Chen, C. S., Tu, S. H., Wang, Y. J., Chang, Y. J., Tam, K. W., Wei, P. L., Cheng, T. C., Chu, J. S., Chen, L. C., Wu, C. H. and Ho, Y. S. Overexpression and activation of the alpha9-nicotinic receptor during tumorigenesis in human breast epithelial cells. *J Natl Cancer Inst.* 2010; 102: 1322-35.
327. Lee, M., Martín-Ruiz, C., Graham, A., Court, J., Jaros, E., Perry, R., Iversen, P., Bauman, M. and Perry, E. Nicotinic receptor abnormalities in the cerebellar cortex in autism. *Brain.* 2002; 125: 1483-95.
328. Lemaire, S., Dumont, M., Mercier, P., Lemaire, I. and Calvert, R. Biochemical characterization of various populations of isolated bovine adrenal chromaffin cells. *Neurochem Int.* 1983; 5: 193-200.
329. Leonard, S., Adams, C., Breese, C. R., Adler, L. E., Bickford, P., Byerley, W., Coon, H., Griffith, J. M., Miller, C., Myles-Worsley, M., Nagamoto, H. T., Rollins, Y., Stevens, K. E., Waldo, M. and Freedman, R. Nicotinic receptor function in schizophrenia. *Schizophr Bull.* 1996; 22: 431-45.
330. Lew, J. Y., Matsumoto, Y., Pearson, J., Goldstein, M., Hokfelt, T. and Fuxe, K. Localization and characterization of phenylethanolamine N-methyl transferase in the brain of various mammalian species. *Brain Res.* 1977; 119: 199-210.
331. Li, S. and Kirouac, G. J. Projections from the paraventricular nucleus of the thalamus to the forebrain, with special emphasis on the extended amygdala. *J Comp Neurol.* 2008; 506: 263-87.
332. Lin, M. T., Wang, P. S., Chuang, J., Fan, L. J. and Won, S. J. Cold stress or a pyrogenic substance elevates thyrotropin-releasing hormone levels in the rat hypothalamus and induces thermogenic reactions. *Neuroendocrinology.* 1989; 50: 177-81.
333. Lindstrom, J. Nicotinic acetylcholine receptors in health and disease. *Mol Neurobiol.* 1997; 15: 193-222.
334. Lingle, C. J., Solaro, C. R., Prakriya, M. and Ding, J. P. Calcium-activated potassium channels in adrenal chromaffin cells. *Ion Channels.* 1996; 4: 261-301.
335. Lioudyno, M., Hiel, H., Kong, J. H., Katz, E., Waldman, E., Parameshwaran-Iyer, S., Glowatzki, E. and Fuchs, P. A. A "synaptoplasmic cistern" mediates rapid inhibition of cochlear hair cells. *J Neurosci.* 2004; 24: 11160-4.
336. Lioudyno, M. I., Verbitsky, M., Glowatzki, E., Holt, J. C., Boulter, J., Zadina, J. E., Elgoyhen, A. B. and Guth, P. S. The alpha9/alpha10-containing nicotinic ACh receptor is directly modulated by opioid peptides, endomorphin-1, and dynorphin B, proposed efferent cotransmitters in the inner ear. *Mol Cell Neurosci.* 2002; 20: 695-711.
337. Lippiello, P. M., Bencherif, M., Gray, J. A., Peters, S., Grigoryan, G., Hodges, H. and Collins, A. C. RJR-2403: a nicotinic agonist with CNS selectivity II. In vivo characterization. *J Pharmacol Exp Ther.* 1996; 279: 1422-9.
338. Lips, K. S., Bruggmann, D., Pfeil, U., Vollerthun, R., Grando, S. A. and Kummer, W. Nicotinic acetylcholine receptors in rat and human placenta. *Placenta.* 2005; 26: 735-46.
339. Lips, K. S., König, P., Schatzle, K., Pfeil, U., Krasteva, G., Spies, M., Haberberger, R. V., Grando, S. A. and Kummer, W. Coexpression and spatial association of nicotinic acetylcholine receptor subunits alpha7 and alpha10 in rat sympathetic neurons. *J Mol Neurosci.* 2006; 30: 15-6.
340. Lips, K. S., Pfeil, U. and Kummer, W. Coexpression of alpha 9 and alpha 10 nicotinic acetylcholine receptors in rat dorsal root ganglion neurons. *Neuroscience.* 2002; 115: 1-5.
341. Lipton, J. M., Avery, D. D. and Marotto, D. R. Determinants of behavioral thermoregulation against heat: thermal intensity and skin temperature levels. *Physiol Behav.* 1970; 5: 1083-8.
342. Liu, L., Chang, G. Q., Jiao, Y. Q. and Simon, S. A. Neuronal nicotinic acetylcholine receptors in rat trigeminal ganglia. *Brain Res.* 1998; 809: 238-45.
343. Liu, R. H., Mizuta, M. and Matsukura, S. The expression and functional role of nicotinic acetylcholine receptors in rat adipocytes. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004; 310: 52-8.
344. Livett, B. G., Dean, D. M., Whelan, L. G., Udenfriend, S. and Rossier, J. Co-release of enkephalin and catecholamines from cultured adrenal chromaffin cells. *Nature.* 1981; 289: 317-9.
345. López, M. G., Montiel, C., Herrero, C. J., García-Palomero, E., Mayorgas, I., Hernández-Guijo, J. M., Villarroja, M., Olivares, R., Gandía, L., McIntosh, J. M., Olivera, B. M. and García, A. G. Unmasking the functions of the chromaffin cell alpha7 nicotinic receptor by using short pulses of acetylcholine and selective blockers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998; 95: 14184-9.

346. Lovell, P. V., James, D. G. and McCobb, D. P. Bovine versus rat adrenal chromaffin cells: big differences in BK potassium channel properties. *J Neurophysiol.* 2000; 83: 3277-86.
347. Lovell, P. V. and McCobb, D. P. Pituitary control of BK potassium channel function and intrinsic firing properties of adrenal chromaffin cells. *J Neurosci.* 2001; 21: 3429-42.
348. Luebke, A. E. and Foster, P. K. Variation in inter-animal susceptibility to noise damage is associated with alpha 9 acetylcholine receptor subunit expression level. *J Neurosci.* 2002; 22: 4241-7.
349. Luebke, A. E., Maroni, P. D., Guth, S. M. and Lysakowski, A. Alpha-9 nicotinic acetylcholine receptor immunoreactivity in the rodent vestibular labyrinth. *J Comp Neurol.* 2005; 492: 323-33.
350. Luo, S., Kulak, J. M., Cartier, G. E., Jacobsen, R. B., Yoshikami, D., Olivera, B. M. and McIntosh, J. M. alpha-conotoxin AulB selectively blocks alpha3 beta4 nicotinic acetylcholine receptors and nicotine-evoked norepinephrine release. *J Neurosci.* 1998; 18: 8571-9.
351. Lustig, L. R. Nicotinic acetylcholine receptor structure and function in the efferent auditory system. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol.* 2006; 288: 424-34.
352. Lustig, L. R., Hiel, H. and Fuchs, P. A. Vestibular hair cells of the chick express the nicotinic acetylcholine receptor subunit alpha 9. *J Vestib Res.* 1999; 9: 359-67.
353. Lustig, L. R. and Peng, H. Chromosome location and characterization of the human nicotinic acetylcholine receptor subunit alpha (alpha) 9 (CHRNA9) gene. *Cytogenet Genome Res.* 2002; 98: 154-9.
354. Lustig, L. R., Peng, H., Hiel, H., Yamamoto, T. and Fuchs, P. A. Molecular cloning and mapping of the human nicotinic acetylcholine receptor alpha10 (CHRNA10). *Genomics.* 2001; 73: 272-83.
355. Lloyd, G. K. and Williams, M. Neuronal nicotinic acetylcholine receptors as novel drug targets. *J Pharmacol Exp Ther.* 2000; 292: 461-7.
356. Maconochie, D. J. and Knight, D. E. A study of the bovine adrenal chromaffin nicotinic receptor using patch clamp and concentration-jump techniques. *J Physiol.* 1992; 454: 129-53.
357. Magarinos, A. M. and McEwen, B. S. Stress-induced atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3c neurons: involvement of glucocorticoid secretion and excitatory amino acid receptors. *Neuroscience.* 1995; 69: 89-98.
358. Makino, S., Smith, M. A. and Gold, P. W. Increased expression of corticotropin-releasing hormone and vasopressin messenger ribonucleic acid (mRNA) in the hypothalamic paraventricular nucleus during repeated stress: association with reduction in glucocorticoid receptor mRNA levels. *Endocrinology.* 1995; 136: 3299-309.
359. Mana, M. J. and Grace, A. A. Chronic cold stress alters the basal and evoked electrophysiological activity of rat locus coeruleus neurons. *Neuroscience.* 1997; 81: 1055-64.
360. Maneckjee, R. and Minna, J. D. Opioid and nicotine receptors affect growth regulation of human lung cancer cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990; 87: 3294-8.
361. Maneu, V., Rojo, J., Mulet, J., Valor, L. M., Sala, F., Criado, M., García, A. G. and Gandía, L. A single neuronal nicotinic receptor alpha3alpha7beta4* is present in the bovine chromaffin cell. *Ann N Y Acad Sci.* 2002; 971: 165-7.
362. Mansvelder, H. D. and McGehee, D. S. Long-term potentiation of excitatory inputs to brain reward areas by nicotine. *Neuron.* 2000; 27: 349-57.
363. Marcantoni, A., Baldelli, P., Hernández-Guijo, J. M., Comunanza, V., Carabelli, V. and Carbone, E. L-type calcium channels in adrenal chromaffin cells: role in pace-making and secretion. *Cell Calcium.* 2007; 42: 397-408.
364. Martin, A. O., Alonso, G. and Guerineau, N. C. Agrin mediates a rapid switch from electrical coupling to chemical neurotransmission during synaptogenesis. *J Cell Biol.* 2005a; 169: 503-14.
365. Martin, A. O., Alonso, G. and Guerineau, N. C. [An unexpected role for agrin on cell-to-cell coupling during synaptogenesis]. *Med Sci (Paris).* 2005b; 21: 913-5.
366. Martin, A. O., Mathieu, M. N., Chevillard, C. and Guerineau, N. C. Gap junctions mediate electrical signaling and ensuing cytosolic Ca²⁺ increases between chromaffin cells in adrenal slices: A role in catecholamine release. *J Neurosci.* 2001; 21: 5397-405.
367. Martin, A. O., Mathieu, M. N. and Guerineau, N. C. Evidence for long-lasting cholinergic control of gap junctional communication between adrenal chromaffin cells. *J Neurosci.* 2003; 23: 3669-78.

368. Marty, A. Ca-dependent K channels with large unitary conductance in chromaffin cell membranes. *Nature*. 1981; 291: 497-500.
369. Marty, A. and Neher, E. Potassium channels in cultured bovine adrenal chromaffin cells. *J Physiol*. 1985; 367: 117-41.
370. Marubio, L. M., del Mar Arroyo-Jiménez, M., Cordero-Erausquin, M., Lena, C., Le Novère, N., de Kerchove d'Exaerde, A., Huchet, M., Damaj, M. I. and Changeux, J. P. Reduced antinociception in mice lacking neuronal nicotinic receptor subunits. *Nature*. 1999; 398: 805-10.
371. Maskos, U. Emerging concepts: novel integration of in vivo approaches to localize the function of nicotinic receptors. *J Neurochem*. 2007; 100: 596-602.
372. Maylie, J., Bond, C. T., Herson, P. S., Lee, W. S. and Adelman, J. P. Small conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels and calmodulin. *J Physiol*. 2004; 554: 255-61.
373. McCleskey, E. W. Calcium channels: cellular roles and molecular mechanisms. *Curr Opin Neurobiol*. 1994; 4: 304-12.
374. McEwen, B. S. Protective and damaging effects of stress mediators. *N Engl J Med*. 1998; 338: 171-9.
375. McEwen, B. S. Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain. *Physiol Rev*. 2007; 87: 873-904.
376. McEwen, B. S. and Stellar, E. Stress and the individual. Mechanisms leading to disease. *Arch Intern Med*. 1993; 153: 2093-101.
377. McEwen, B. S. and Wingfield, J. C. The concept of allostasis in biology and biomedicine. *Horm Behav*. 2003; 43: 2-15.
378. McGehee, D. S. and Role, L. W. Physiological diversity of nicotinic acetylcholine receptors expressed by vertebrate neurons. *Annu Rev Physiol*. 1995; 57: 521-46.
379. McIntosh, J. M., Absalom, N., Chebib, M., Elgoyhen, A. B. and Vincler, M. Alpha9 nicotinic acetylcholine receptors and the treatment of pain. *Biochem Pharmacol*. 2009; 78: 693-702.
380. McIntosh, J. M., Azam, L., Staheli, S., Dowell, C., Lindstrom, J. M., Kuryatov, A., Garrett, J. E., Marks, M. J. and Whiteaker, P. Analogs of alpha-conotoxin MII are selective for alpha6-containing nicotinic acetylcholine receptors. *Mol Pharmacol*. 2004; 65: 944-52.
381. McIntosh, J. M., Dowell, C., Watkins, M., Garrett, J. E., Yoshikami, D. and Olivera, B. M. Alpha-conotoxin GIC from *Conus geographus*, a novel peptide antagonist of nicotinic acetylcholine receptors. *J Biol Chem*. 2002; 277: 33610-5.
382. McNiven, A. I., Yuhas, W. A. and Fuchs, P. A. Ionic dependence and agonist preference of an acetylcholine receptor in hair cells. *Auditory Neuroscience*. 1996; 2: 63-77.
383. Meda, P., Pepper, M. S., Traub, O., Willecke, K., Gros, D., Beyer, E., Nicholson, B., Paul, D. and Orci, L. Differential expression of gap junction connexins in endocrine and exocrine glands. *Endocrinology*. 1993; 133: 2371-8.
384. Mefford, I. N. Epinephrine in mammalian brain. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 1988; 12: 365-88.
385. Mehta, P. P. Introduction: a tribute to cell-to-cell channels. *J Membr Biol*. 2007; 217: 5-12.
386. Merlie, J. P. and Smith, M. M. Synthesis and assembly of acetylcholine receptor, a multisubunit membrane glycoprotein. *J Membr Biol*. 1986; 91: 1-10.
387. Micutkova, L., Rychkova, N., Sabban, E. L., Krizanova, O. and Kvetnansky, R. Quantitation of changes in gene expression of norepinephrine biosynthetic enzymes in rat stellate ganglia induced by stress. *Neurochem Int*. 2003; 43: 235-42.
388. Millar, N. S. RIC-3: a nicotinic acetylcholine receptor chaperone. *Br J Pharmacol*. 2008; 153 Suppl 1: S177-83.
389. Millar, N. S. and Harkness, P. C. Assembly and trafficking of nicotinic acetylcholine receptors (Review). *Mol Membr Biol*. 2008; 25: 279-92.
390. Miner, L. L., Baruchin, A. and Kaplan, B. B. Effect of cold stress on cholinergic receptors in the rat adrenal gland. *Neurosci Lett*. 1989; 106: 339-44.
391. Minna, J. D. Nicotine exposure and bronchial epithelial cell nicotinic acetylcholine receptor expression in the pathogenesis of lung cancer. *J Clin Invest*. 2003; 111: 31-3.
392. Miyata, S., Ishiyama, M., Shido, O., Nakashima, T., Shibata, M. and Kiyohara, T. Central mechanism of neural activation with cold acclimation of rats using Fos immunohistochemistry. *Neurosci Res*. 1995; 22: 209-18.

-
393. Miyazawa, A., Fujiyoshi, Y., Stowell, M. and Unwin, N. Nicotinic acetylcholine receptor at 4.6 Å resolution: transverse tunnels in the channel wall. *J Mol Biol.* 1999; 288: 765-86.
394. Miyazawa, A., Fujiyoshi, Y. and Unwin, N. Structure and gating mechanism of the acetylcholine receptor pore. *Nature.* 2003; 423: 949-55.
395. Moga, M. M., Weis, R. P. and Moore, R. Y. Efferent projections of the paraventricular thalamic nucleus in the rat. *J Comp Neurol.* 1995; 359: 221-38.
396. Mogg, A. J., Whiteaker, P., McIntosh, J. M., Marks, M., Collins, A. C. and Wonnacott, S. Methyllycaconitine is a potent antagonist of alpha-conotoxin-MII-sensitive presynaptic nicotinic acetylcholine receptors in rat striatum. *J Pharmacol Exp Ther.* 2002; 302: 197-204.
397. Mollard, P., Seward, E. P. and Nowycky, M. C. Activation of nicotinic receptors triggers exocytosis from bovine chromaffin cells in the absence of membrane depolarization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995; 92: 3065-9.
398. Moretti, M., Zoli, M., George, A. A., Lukas, R. J., Pistillo, F., Maskos, U., Whiteaker, P. and Gotti, C. The novel alpha7beta2-nicotinic acetylcholine receptor subtype is expressed in mouse and human basal forebrain: biochemical and pharmacological characterization. *Mol Pharmacol.* 2014; 86: 306-17.
399. Morinville, A., Fundin, B., Meury, L., Jureus, A., Sandberg, K., Krupp, J., Ahmad, S. and O'Donnell, D. Distribution of the voltage-gated sodium channel Na(v)1.7 in the rat: expression in the autonomic and endocrine systems. *J Comp Neurol.* 2007; 504: 680-9.
400. Morley, B. J., Li, H. S., Hiel, H., Drescher, D. G. and Elgoyhen, A. B. Identification of the subunits of the nicotinic cholinergic receptors in the rat cochlea using RT-PCR and in situ hybridization. *Brain Res Mol Brain Res.* 1998; 53: 78-87.
401. Morley, B. J. and Simmons, D. D. Developmental mRNA expression of the alpha10 nicotinic acetylcholine receptor subunit in the rat cochlea. *Brain Res Dev Brain Res.* 2002; 139: 87-96.
402. Moroni, M., Zwart, R., Sher, E., Cassels, B. K. and Bermudez, I. alpha4beta2 nicotinic receptors with high and low acetylcholine sensitivity: pharmacology, stoichiometry, and sensitivity to long-term exposure to nicotine. *Mol Pharmacol.* 2006; 70: 755-68.
403. Morrison, S. F. and Cao, W. H. Different adrenal sympathetic preganglionic neurons regulate epinephrine and norepinephrine secretion. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2000; 279: R1763-75.
404. Moser, T. Low-conductance intercellular coupling between mouse chromaffin cells in situ. *J Physiol.* 1998; 506 (Pt 1): 195-205.
405. Mousavi, M., Hellstrom-Lindahl, E., Guan, Z. Z., Bednar, I. and Nordberg, A. Expression of nicotinic acetylcholine receptors in human and rat adrenal medulla. *Life Sci.* 2001; 70: 577-90.
406. Mulle, C., Lena, C. and Changeux, J. P. Potentiation of nicotinic receptor response by external calcium in rat central neurons. *Neuron.* 1992; 8: 937-45.
407. Murray, S. A., Davis, K. and Gay, V. ACTH and adrenocortical gap junctions. *Microsc Res Tech.* 2003; 61: 240-6.
408. Murray, S. A., Nickel, B. M. and Gay, V. L. Gap junctions as modulators of adrenal cortical cell proliferation and steroidogenesis. *Mol Cell Endocrinol.* 2009; 300: 51-6.
409. Murray, S. A. and Pharrams, S. Y. Comparison of gap junction expression in the adrenal gland. *Microsc Res Tech.* 1997; 36: 510-9.
410. Murray, T. A., Bertrand, D., Papke, R. L., George, A. A., Pantoja, R., Srinivasan, R., Liu, Q., Wu, J., Whiteaker, P., Lester, H. A. and Lukas, R. J. alpha7beta2 nicotinic acetylcholine receptors assemble, function, and are activated primarily via their alpha7-alpha7 interfaces. *Mol Pharmacol.* 2012; 81: 175-88.
411. Myslivecek, J. and Kvetnansky, R. The effects of stress on muscarinic receptors. Heterologous receptor regulation: yes or no? *Auton Autacoid Pharmacol.* 2006; 26: 235-51.
412. Nagatsu, T. Tyrosine hydroxylase: human isoforms, structure and regulation in physiology and pathology. *Essays Biochem.* 1995; 30: 15-35.
413. Napier, I. A., Klimis, H., Rycroft, B. K., Jin, A. H., Alewood, P. F., Motin, L., Adams, D. J. and Christie, M. J. Intrathecal alpha-conotoxins Vc1.1, AulB and MII acting on distinct nicotinic receptor subtypes reverse signs of neuropathic pain. *Neuropharmacology.* 2012; 62: 2202-7.
414. Nassar-Gentina, V., Pollard, H. B. and Rojas, E. Electrical activity in chromaffin cells of intact mouse adrenal gland. *Am J Physiol.* 1988; 254: C675-83.
-

415. Neely, A. and Lingle, C. J. Two components of calcium-activated potassium current in rat adrenal chromaffin cells. *J Physiol.* 1992; 453: 97-131.
416. Neher, E. and Marty, A. Discrete changes of cell membrane capacitance observed under conditions of enhanced secretion in bovine adrenal chromaffin cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1982; 79: 6712-6.
417. Neher, E. and Sakmann, B. Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature.* 1976; 260: 799-802.
418. Nelson, M. E., Wang, F., Kuryatov, A., Choi, C. H., Gerzanich, V. and Lindstrom, J. Functional properties of human nicotinic AChRs expressed by IMR-32 neuroblastoma cells resemble those of $\alpha 3\beta 4$ AChRs expressed in permanently transfected HEK cells. *J Gen Physiol.* 2001; 118: 563-82.
419. Nenov, A. P., Norris, C. and Bobbin, R. P. Acetylcholine response in guinea pig outer hair cells. II. Activation of a small conductance $\text{Ca}(2+)$ -activated K^+ channel. *Hear Res.* 1996; 101: 149-72.
420. Newhouse, P. A., Potter, A. and Levin, E. D. Nicotinic system involvement in Alzheimer's and Parkinson's diseases. Implications for therapeutics. *Drugs Aging.* 1997; 11: 206-28.
421. Nguyen, V. T., Ndoye, A. and Grando, S. A. Novel human $\alpha 9$ acetylcholine receptor regulating keratinocyte adhesion is targeted by Pemphigus vulgaris autoimmunity. *Am J Pathol.* 2000; 157: 1377-91.
422. Nie, L., Song, H., Chen, M. F., Chiamvimonvat, N., Beisel, K. W., Yamoah, E. N. and Vázquez, A. E. Cloning and expression of a small-conductance $\text{Ca}(2+)$ -activated K^+ channel from the mouse cochlea: coexpression with $\alpha 9/\alpha 10$ acetylcholine receptors. *J Neurophysiol.* 2004; 91: 1536-44.
423. Nisenbaum, L. K. and Abercrombie, E. D. Presynaptic alterations associated with enhancement of evoked release and synthesis of norepinephrine in hippocampus of chronically cold-stressed rats. *Brain Res.* 1993; 608: 280-7.
424. Noda, M., Takahashi, H., Tanabe, T., Toyosato, M., Furutani, Y., Hirose, T., Asai, M., Inayama, S., Miyata, T. and Numa, S. Primary structure of α -subunit precursor of Torpedo californica acetylcholine receptor deduced from cDNA sequence. *Nature.* 1982; 299: 793-7.
425. Noda, M., Takahashi, H., Tanabe, T., Toyosato, M., Kikuyotani, S., Hirose, T., Asai, M., Takashima, H., Inayama, S., Miyata, T. and Numa, S. Primary structures of β - and δ -subunit precursors of Torpedo californica acetylcholine receptor deduced from cDNA sequences. *Nature.* 1983; 301: 251-5.
426. Nooney, J. M., Peters, J. A. and Lambert, J. J. A patch clamp study of the nicotinic acetylcholine receptor of bovine adrenomedullary chromaffin cells in culture. *J Physiol.* 1992; 455: 503-27.
427. Novara, M., Baldelli, P., Cavallari, D., Carabelli, V., Giancippoli, A. and Carbone, E. Exposure to cAMP and β -adrenergic stimulation recruits $\text{Ca}(V)3$ T-type channels in rat chromaffin cells through Epac cAMP-receptor proteins. *J Physiol.* 2004; 558: 433-49.
428. Ohtani, N., Sugano, T. and Ohta, M. Alterations in monoamines and GABA in the ventromedial and paraventricular nuclei of the hypothalamus following cold exposure: a reduction in noradrenaline induces hyperphagia. *Brain Res.* 1999; 842: 6-14.
429. Oliver, D., Klocker, N., Schuck, J., Baukowitz, T., Ruppersberg, J. P. and Fakler, B. Gating of $\text{Ca}2+$ -activated K^+ channels controls fast inhibitory synaptic transmission at auditory outer hair cells. *Neuron.* 2000; 26: 595-601.
430. Olivos-Oré, L. Caracterización farmacológica y funcional del receptor nicotínico $\alpha 9\alpha 10$ de la célula cromafín de la rata. 2009. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
431. Olivos, L. and Artalejo, A. R. Muscarinic excitation-secretion coupling in chromaffin cells. *Acta Physiol (Oxf).* 2008; 192: 213-20.
432. Olivos Ore, L. and Artalejo, A. R. Intracellular $\text{Ca}2+$ microdomain-triggered exocytosis in neuroendocrine cells. *Trends Neurosci.* 2004; 27: 113-5.
433. Pacak, K. and Palkovits, M. Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders. *Endocr Rev.* 2001; 22: 502-48.
434. Pacak, K., Palkovits, M., Yadid, G., Kvtnansky, R., Kopin, I. J. and Goldstein, D. S. Heterogeneous neurochemical responses to different stressors: a test of Selye's doctrine of nonspecificity. *Am J Physiol.* 1998; 275: R1247-55.
435. Palkovits, M., Baffi, J. S. and Dvori, S. Neuronal organization of stress response. Pain-induced c-fos expression in brain stem catecholaminergic cell groups. *Ann N Y Acad Sci.* 1995; 771: 313-26.
436. Palkovits, M. and Brownstein, M. J. Handbook of chemical neuroanatomy. 1985; 4: 1-71.

437. Palma, E., Bertrand, S., Binzoni, T. and Bertrand, D. Neuronal nicotinic alpha 7 receptor expressed in *Xenopus* oocytes presents five putative binding sites for methyllycaconitine. *J Physiol.* 1996; 491 (Pt 1): 151-61.
438. Palma, E., Maggi, L., Barabino, B., Eusebi, F. and Ballivet, M. Nicotinic acetylcholine receptors assembled from the alpha7 and beta3 subunits. *J Biol Chem.* 1999; 274: 18335-40.
439. Papke, R. L., Webster, J. C., Lippiello, P. M., Bencherif, M. and Francis, M. M. The activation and inhibition of human nicotinic acetylcholine receptor by RJR-2403 indicate a selectivity for the alpha4beta2 receptor subtype. *J Neurochem.* 2000; 75: 204-16.
440. Paradiso, K., Sabey, K., Evers, A. S., Zorumski, C. F., Covey, D. F. and Steinbach, J. H. Steroid inhibition of rat neuronal nicotinic alpha4beta2 receptors expressed in HEK 293 cells. *Mol Pharmacol.* 2000; 58: 341-51.
441. Park, Y. B. Ion selectivity and gating of small conductance Ca(2+)-activated K⁺ channels in cultured rat adrenal chromaffin cells. *J Physiol.* 1994; 481 (Pt 3): 555-70.
442. Parker, T. L., Kesse, W. K., Mohamed, A. A. and Afework, M. The innervation of the mammalian adrenal gland. *J Anat.* 1993; 183 (Pt 2): 265-76.
443. Parker, T. L., Mohamed, A. A. and Coupland, R. E. The innervation of the adrenal gland. IV. The source of pre- and postganglionic nerve fibres to the guinea-pig adrenal gland. *J Anat.* 1990; 172: 17-24.
444. Parsons, T. D., Coorsen, J. R., Horstmann, H. and Almers, W. Docked granules, the exocytic burst, and the need for ATP hydrolysis in endocrine cells. *Neuron.* 1995; 15: 1085-96.
445. Paterson, D. and Nordberg, A. Neuronal nicotinic receptors in the human brain. *Prog Neurobiol.* 2000; 61: 75-111.
446. Patronas, P., Horowitz, M., Simon, E. and Gerstberger, R. Differential stimulation of c-fos expression in hypothalamic nuclei of the rat brain during short-term heat acclimation and mild dehydration. *Brain Res.* 1998; 798: 127-39.
447. Patti, L., Raiteri, L., Grilli, M., Parodi, M., Raiteri, M. and Marchi, M. P2X(7) receptors exert a permissive role on the activation of release-enhancing presynaptic alpha7 nicotinic receptors co-existing on rat neocortex glutamatergic terminals. *Neuropharmacology.* 2006; 50: 705-13.
448. Peng, H., Ferris, R. L., Matthews, T., Hiel, H., López-Albaitero, A. and Lustig, L. R. Characterization of the human nicotinic acetylcholine receptor subunit alpha (alpha) 9 (CHRNA9) and alpha (alpha) 10 (CHRNA10) in lymphocytes. *Life Sci.* 2004; 76: 263-80.
449. Pérez-Álvarez, A. and Albillos, A. Key role of the nicotinic receptor in neurotransmitter exocytosis in human chromaffin cells. *J Neurochem.* 2007; 103: 2281-90.
450. Pérez-Álvarez, A., Hernández-Vivanco, A., Alonso, Y. G. S., Tabernero, A., McIntosh, J. M. and Albillos, A. Pharmacological characterization of native alpha7 nicotinic ACh receptors and their contribution to depolarization-elicited exocytosis in human chromaffin cells. *Br J Pharmacol.* 2012a; 165: 908-21.
451. Pérez-Álvarez, A., Hernández-Vivanco, A., Caba-González, J. C. and Albillos, A. Different roles attributed to Cav1 channel subtypes in spontaneous action potential firing and fine tuning of exocytosis in mouse chromaffin cells. *J Neurochem.* 2011; 116: 105-21.
452. Pérez-Álvarez, A., Hernández-Vivanco, A., McIntosh, J. M. and Albillos, A. Native alpha6beta4* nicotinic receptors control exocytosis in human chromaffin cells of the adrenal gland. *FASEB J.* 2012b; 26: 346-54.
453. Peters, R., Brunger, A. and Schulten, K. Continuous fluorescence microphotolysis: A sensitive method for study of diffusion processes in single cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1981; 78: 962-6.
454. Picciotto, M. R., Caldarone, B. J., Brunzell, D. H., Zachariou, V., Stevens, T. R. and King, S. L. Neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit knockout mice: physiological and behavioral phenotypes and possible clinical implications. *Pharmacol Ther.* 2001; 92: 89-108.
455. Plattner, H., Artalejo, A. R. and Neher, E. Ultrastructural organization of bovine chromaffin cell cortex-analysis by cryofixation and morphometry of aspects pertinent to exocytosis. *J Cell Biol.* 1997; 139: 1709-17.
456. Plazas, P. V., Katz, E., Gómez-Casati, M. E., Bouzat, C. and Elgoyhen, A. B. Stoichiometry of the alpha9alpha10 nicotinic cholinergic receptor. *J Neurosci.* 2005; 25: 10905-12.
457. Prince, R. J. and Sine, S. M. Acetylcholine and epibatidine binding to muscle acetylcholine receptors distinguish between concerted and uncoupled models. *J Biol Chem.* 1999; 274: 19623-9.

458. Pullar, C. E., Rizzo, A. and Isseroff, R. R. beta-Adrenergic receptor antagonists accelerate skin wound healing: evidence for a catecholamine synthesis network in the epidermis. *J Biol Chem.* 2006; 281: 21225-35.
459. Quik, M., Chan, J. and Patrick, J. alpha-Bungarotoxin blocks the nicotinic receptor mediated increase in cell number in a neuroendocrine cell line. *Brain Res.* 1994; 655: 161-7.
460. Quik, M., Polonskaya, Y., Gillespie, A., Jakowec, M., Lloyd, G. K. and Langston, J. W. Localization of nicotinic receptor subunit mRNAs in monkey brain by in situ hybridization. *J Comp Neurol.* 2000; 425: 58-69.
461. Radley, J. J., Rocher, A. B., Rodríguez, A., Ehlenberger, D. B., Dammann, M., McEwen, B. S., Morrison, J. H., Wearne, S. L. and Hof, P. R. Repeated stress alters dendritic spine morphology in the rat medial prefrontal cortex. *J Comp Neurol.* 2008; 507: 1141-50.
462. Raggenbass, M. and Bertrand, D. Nicotinic receptors in circuit excitability and epilepsy. *J Neurobiol.* 2002; 53: 580-9.
463. Ramírez-Latorre, J., Yu, C. R., Qu, X., Perin, F., Karlin, A. and Role, L. Functional contributions of alpha5 subunit to neuronal acetylcholine receptor channels. *Nature.* 1996; 380: 347-51.
464. Rau, K. K., Johnson, R. D. and Cooper, B. Y. Nicotinic AChR in subclassified capsaicin-sensitive and -insensitive nociceptors of the rat DRG. *J Neurophysiol.* 2005; 93: 1358-71.
465. Ren, X. Q., Cheng, S. B., Treuil, M. W., Mukherjee, J., Rao, J., Braunewell, K. H., Lindstrom, J. M. and Anand, R. Structural determinants of alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptor trafficking. *J Neurosci.* 2005; 25: 6676-86.
466. Rettig, J. and Neher, E. Emerging roles of presynaptic proteins in Ca⁺⁺-triggered exocytosis. *Science.* 2002; 298: 781-5.
467. Role, L. W. and Berg, D. K. Nicotinic receptors in the development and modulation of CNS synapses. *Neuron.* 1996; 16: 1077-85.
468. Romano, C. and Goldstein, A. Stereospecific nicotine receptors on rat brain membranes. *Science.* 1980; 210: 647-50.
469. Rondeel, J. M., de Greef, W. J., Hop, W. C., Rowland, D. L. and Visser, T. J. Effect of cold exposure on the hypothalamic release of thyrotropin-releasing hormone and catecholamines. *Neuroendocrinology.* 1991; 54: 477-81.
470. Rothlin, C. V., Katz, E., Verbitsky, M., Vetter, D. E., Heinemann, S. F. and Elgoyhen, A. B. Block of the alpha9 nicotinic receptor by ototoxic aminoglycosides. *Neuropharmacology.* 2000; 39: 2525-32.
471. Rothlin, C. V., Lioudyno, M. I., Silbering, A. F., Plazas, P. V., Casati, M. E., Katz, E., Guth, P. S. and Elgoyhen, A. B. Direct interaction of serotonin type 3 receptor ligands with recombinant and native alpha 9 alpha 10-containing nicotinic cholinergic receptors. *Mol Pharmacol.* 2003; 63: 1067-74.
472. Rust, G., Burgunder, J. M., Lauterburg, T. E. and Cachelin, A. B. Expression of neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit genes in the rat autonomic nervous system. *Eur J Neurosci.* 1994; 6: 478-85.
473. Sabban, E. L. and Kvetnansky, R. Stress-triggered activation of gene expression in catecholaminergic systems: dynamics of transcriptional events. *Trends Neurosci.* 2001; 24: 91-8.
474. Sáez, J. C., Berthoud, V. M., Branes, M. C., Martínez, A. D. and Beyer, E. C. Plasma membrane channels formed by connexins: their regulation and functions. *Physiol Rev.* 2003; 83: 1359-400.
475. Sala, F., Nistri, A. and Criado, M. Nicotinic acetylcholine receptors of adrenal chromaffin cells. *Acta Physiol (Oxf).* 2008; 192: 203-12.
476. Sala, S. and Soria, B. Inactivation of Delayed Potassium Current in Cultured Bovine Chromaffin Cells. *Eur J Neurosci.* 1991; 3: 462-472.
477. Salpeter, M. M. and Loring, R. H. Nicotinic acetylcholine receptors in vertebrate muscle: properties, distribution and neural control. *Prog Neurobiol.* 1985; 25: 297-325.
478. Sanes, J. R. and Lichtman, J. W. Development of the vertebrate neuromuscular junction. *Annu Rev Neurosci.* 1999; 22: 389-442.
479. Saragoza, P. A., Modir, J. G., Goel, N., French, K. L., Li, L., Nowak, M. W. and Stitzel, J. A. Identification of an alternatively processed nicotinic receptor alpha7 subunit RNA in mouse brain. *Brain Res Mol Brain Res.* 2003; 117: 15-26.
480. Sargent, P. B. The diversity of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Annu Rev Neurosci.* 1993; 16: 403-43.

481. Satinoff, E. Neural organization and evolution of thermal regulation in mammals. *Science*. 1978; 201: 16-22.
482. Satkunathan, N., Livett, B., Gayler, K., Sandall, D., Down, J. and Khalil, Z. Alpha-conotoxin Vc1.1 alleviates neuropathic pain and accelerates functional recovery of injured neurones. *Brain Res*. 2005; 1059: 149-58.
483. Scammell, T. E., Price, K. J. and Sagar, S. M. Hyperthermia induces c-fos expression in the preoptic area. *Brain Res*. 1993; 618: 303-7.
484. Scott, R. S., Bustillo, D., Olivos-Ore, L. A., Cuchillo-Ibanez, I., Barahona, M. V., Carbone, E. and Artalejo, A. R. Contribution of BK channels to action potential repolarisation at minimal cytosolic Ca²⁺ concentration in chromaffin cells. *Pflugers Arch*. 2011; 462: 545-57.
485. Scheurink, A. and Ritter, S. Sympathoadrenal responses to glucoprivation and lipoprivation in rats. *Physiol Behav*. 1993; 53: 995-1000.
486. Schoepfer, R., Conroy, W. G., Whiting, P., Gore, M. and Lindstrom, J. Brain alpha-bungarotoxin binding protein cDNAs and MABs reveal subtypes of this branch of the ligand-gated ion channel gene superfamily. *Neuron*. 1990; 5: 35-48.
487. Schuller, H. M. and Orloff, M. Tobacco-specific carcinogenic nitrosamines. Ligands for nicotinic acetylcholine receptors in human lung cancer cells. *Biochem Pharmacol*. 1998; 55: 1377-84.
488. Seguela, P., Wadiche, J., Dineley-Miller, K., Dani, J. A. and Patrick, J. W. Molecular cloning, functional properties, and distribution of rat brain alpha 7: a nicotinic cation channel highly permeable to calcium. *J Neurosci*. 1993; 13: 596-604.
489. Selye, H. A syndrome produced by diverse noxious agents. *Nature*. 1936; 138:
490. Selye, H. The general adaptation syndrome and the diseases of adaptation. *J Clin Endocrinol Metab*. 1946; 6: 117-230.
491. Selye, H. Stress and the general adaptation syndrome. *Br Med J*. 1950; 1: 1383-92.
492. Selye, H. Stress without distress. 1974.
493. Sesack, S. R., Deutch, A. Y., Roth, R. H. and Bunney, B. S. Topographical organization of the efferent projections of the medial prefrontal cortex in the rat: an anterograde tract-tracing study with Phaseolus vulgaris leucoagglutinin. *J Comp Neurol*. 1989; 290: 213-42.
494. Severance, E. G., Zhang, H., Cruz, Y., Pakhlevanians, S., Hadley, S. H., Amin, J., Wecker, L., Reed, C. and Cuevas, J. The alpha7 nicotinic acetylcholine receptor subunit exists in two isoforms that contribute to functional ligand-gated ion channels. *Mol Pharmacol*. 2004; 66: 420-9.
495. Sgard, F., Charpentier, E., Bertrand, S., Walker, N., Caput, D., Graham, D., Bertrand, D. and Besnard, F. A novel human nicotinic receptor subunit, alpha10, that confers functionality to the alpha9-subunit. *Mol Pharmacol*. 2002; 61: 150-9.
496. Sgoifo, A., Koolhaas, J., De Boer, S., Musso, E., Stilli, D., Buwalda, B. and Meerlo, P. Social stress, autonomic neural activation, and cardiac activity in rats. *Neurosci Biobehav Rev*. 1999; 23: 915-23.
497. Smit, A. B., Brejc, K., Syed, N. and Sixma, T. K. Structure and function of AChBP, homologue of the ligand-binding domain of the nicotinic acetylcholine receptor. *Ann N Y Acad Sci*. 2003; 998: 81-92.
498. Smit, A. B., Syed, N. I., Schaap, D., van Minnen, J., Klumperman, J., Kits, K. S., Lodder, H., van der Schors, R. C., van Elk, R., Sorgedrager, B., Brejc, K., Sixma, T. K. and Geraerts, W. P. A glia-derived acetylcholine-binding protein that modulates synaptic transmission. *Nature*. 2001; 411: 261-8.
499. Smith, C. W. and Valcarcel, J. Alternative pre-mRNA splicing: the logic of combinatorial control. *Trends Biochem Sci*. 2000; 25: 381-8.
500. Solaro, C. R. and Lingle, C. J. Trypsin-sensitive, rapid inactivation of a calcium-activated potassium channel. *Science*. 1992; 257: 1694-8.
501. Solís-Garrido, L. M. Identificación, clonaje y expresión heteróloga de las subunidades nicotínica $\alpha 9$ y $\alpha 10$ de la células cromafín. Tesis Doctoral leída en la Universidad Autónoma de Madrid. 2006.
502. Sorek, R., Shamir, R. and Ast, G. How prevalent is functional alternative splicing in the human genome? *Trends Genet*. 2004; 20: 68-71.
503. Souvannakitti, D., Nanduri, J., Yuan, G., Kumar, G. K., Fox, A. P. and Prabhakar, N. R. NADPH oxidase-dependent regulation of T-type Ca²⁺ channels and ryanodine receptors mediate the augmented exocytosis of catecholamines from intermittent hypoxia-treated neonatal rat chromaffin cells. *J Neurosci*. 2010; 30: 10763-72.

504. Staten, M. A., Matthews, D. E., Cryer, P. E. and Bier, D. M. Physiological increments in epinephrine stimulate metabolic rate in humans. *Am J Physiol.* 1987; 253: E322-30.
505. Steinlein, O. K., Mulley, J. C., Propping, P., Wallace, R. H., Phillips, H. A., Sutherland, G. R., Scheffer, I. E. and Berkovic, S. F. A missense mutation in the neuronal nicotinic acetylcholine receptor alpha 4 subunit is associated with autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. *Nat Genet.* 1995; 11: 201-3.
506. Sterling, P. and Eyer, J. Allostasis: a new paradigm to explain arousal pathology. *Handbook of Life Stress, Cognition and Health.* 1988; 629-649.
507. Strader, C. D. and Raftery, M. A. Topographic studies of Torpedo acetylcholine receptor subunits as a transmembrane complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1980; 77: 5807-11.
508. Stroth, N., Kuri, B. A., Mustafa, T., Chan, S. A., Smith, C. B. and Eiden, L. E. PACAP controls adrenomedullary catecholamine secretion and expression of catecholamine biosynthetic enzymes at high splanchnic nerve firing rates characteristic of stress transduction in male mice. *Endocrinology.* 2013; 154: 330-9.
509. Sun, C. L., Thoa, N. B. and Kopin, I. J. Comparison of the effects of 2-deoxyglucose and immobilization on plasma levels of catecholamines and corticosterone in awake rats. *Endocrinology.* 1979; 105: 306-11.
510. Sziklai, I. The significance of the calcium signal in the outer hair cells and its possible role in tinnitus of cochlear origin. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2004; 261: 517-25.
511. Tachikawa, E., Mizuma, K., Kudo, K., Kashimoto, T., Yamato, S. and Ohta, S. Characterization of the functional subunit combination of nicotinic acetylcholine receptors in bovine adrenal chromaffin cells. *Neurosci Lett.* 2001; 312: 161-4.
512. Tai, T. C., Claycomb, R., Her, S., Bloom, A. K. and Wong, D. L. Glucocorticoid responsiveness of the rat phenylethanolamine N-methyltransferase gene. *Mol Pharmacol.* 2002; 61: 1385-92.
513. Taly, A., Corringer, P. J., Grutter, T., Prado de Carvalho, L., Karplus, M. and Changeux, J. P. Implications of the quaternary twist allosteric model for the physiology and pathology of nicotinic acetylcholine receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006; 103: 16965-70.
514. Tasneem, A., Iyer, L. M., Jakobsson, E. and Aravind, L. Identification of the prokaryotic ligand-gated ion channels and their implications for the mechanisms and origins of animal Cys-loop ion channels. *Genome Biol.* 2005; 6: R4.
515. Tedford, H. W. and Zamponi, G. W. Direct G protein modulation of Cav2 calcium channels. *Pharmacol Rev.* 2006; 58: 837-62.
516. Toledo-Aral, J. J., Moss, B. L., He, Z. J., Koszowski, A. G., Whisenand, T., Levinson, S. R., Wolf, J. J., Silos-Santiago, I., Haleboua, S. and Mandel, G. Identification of PN1, a predominant voltage-dependent sodium channel expressed principally in peripheral neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997; 94: 1527-32.
517. Tomlinson, A. and Coupland, R. E. The innervation of the adrenal gland. IV. Innervation of the rat adrenal medulla from birth to old age. A descriptive and quantitative morphometric and biochemical study of the innervation of chromaffin cells and adrenal medullary neurons in Wistar rats. *J Anat.* 1990; 169: 209-36.
518. Tonini, R., Renzi, M. and Eusebi, F. Unliganded human mutant alpha 7 nicotinic receptors are modulated by Ca²⁺ and trace levels of Zn²⁺. *Neuropharmacology.* 2004; 46: 727-33.
519. Tu, S. H., Ku, C. Y., Ho, C. T., Chen, C. S., Huang, C. S., Lee, C. H., Chen, L. C., Pan, M. H., Chang, H. W., Chang, C. H., Chang, Y. J., Wei, P. L., Wu, C. H. and Ho, Y. S. Tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibits nicotine- and estrogen-induced alpha9-nicotinic acetylcholine receptor upregulation in human breast cancer cells. *Mol Nutr Food Res.* 2011; 55: 455-66.
520. Uceda, G., Artalejo, A. R., López, M. G., Abad, F., Neher, E. and García, A. G. Ca(2+)-activated K⁺ channels modulate muscarinic secretion in cat chromaffin cells. *J Physiol.* 1992; 454: 213-30.
521. Ulrich-Lai, Y. M., Ostrander, M. M., Thomas, I. M., Packard, B. A., Furay, A. R., Dolgas, C. M., Van Hooren, D. C., Figueiredo, H. F., Mueller, N. K., Choi, D. C. and Herman, J. P. Daily limited access to sweetened drink attenuates hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis stress responses. *Endocrinology.* 2007; 148: 1823-34.
522. Ullian, E. M., McIntosh, J. M. and Sargent, P. B. Rapid synaptic transmission in the avian ciliary ganglion is mediated by two distinct classes of nicotinic receptors. *J Neurosci.* 1997; 17: 7210-9.
523. Unwin, N. Nicotinic acetylcholine receptor at 9 Å resolution. *J Mol Biol.* 1993; 229: 1101-24.
524. Unwin, N. Acetylcholine receptor channel imaged in the open state. *Nature.* 1995; 373: 37-43.

525. Unwin, N. Structure and action of the nicotinic acetylcholine receptor explored by electron microscopy. *FEBS Lett.* 2003; 555: 91-5.
526. Unwin, N. Refined structure of the nicotinic acetylcholine receptor at 4Å resolution. *J Mol Biol.* 2005; 346: 967-89.
527. Unwin, P. N. Gap junction structure and the control of cell-to-cell communication. *Ciba Found Symp.* 1987; 125: 78-91.
528. Vailati, S., Hanke, W., Bejan, A., Barabino, B., Longhi, R., Balestra, B., Moretti, M., Clementi, F. and Gotti, C. Functional alpha6-containing nicotinic receptors are present in chick retina. *Mol Pharmacol.* 1999; 56: 11-9.
529. Vallejo, Y. F., Buisson, B., Bertrand, D. and Green, W. N. Chronic nicotine exposure upregulates nicotinic receptors by a novel mechanism. *J Neurosci.* 2005; 25: 5563-72.
530. Van der Kloot, W., Molgo, J., Cameron, R. and Colasante, C. Vesicle size and transmitter release at the frog neuromuscular junction when quantal acetylcholine content is increased or decreased. *J Physiol.* 2002; 541: 385-93.
531. Vandael, D. H., Ottaviani, M. M., Legros, C., Lefort, C., Guerineau, N. C., Allio, A., Carabelli, V. and Carbone, E. Reduced availability of voltage-gated sodium channels by depolarization or blockade by tetrodotoxin boosts burst firing and catecholamine release in mouse chromaffin cells. *J Physiol.* 2015; 593: 905-27.
532. Vandael, D. H., Zuccotti, A., Striessnig, J. and Carbone, E. Ca(V)1.3-driven SK channel activation regulates pacemaking and spike frequency adaptation in mouse chromaffin cells. *J Neurosci.* 2012; 32: 16345-59.
533. Verbitsky, M., Rothlin, C. V., Katz, E. and Elgoyhen, A. B. Mixed nicotinic-muscarinic properties of the alpha9 nicotinic cholinergic receptor. *Neuropharmacology.* 2000; 39: 2515-24.
534. Vernino, S., Amador, M., Luetje, C. W., Patrick, J. and Dani, J. A. Calcium modulation and high calcium permeability of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Neuron.* 1992; 8: 127-34.
535. Vetter, D. E., Katz, E., Maison, S. F., Taranda, J., Turcan, S., Ballester, J., Liberman, M. C., Elgoyhen, A. B. and Boulter, J. The alpha10 nicotinic acetylcholine receptor subunit is required for normal synaptic function and integrity of the olivocochlear system. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007; 104: 20594-9.
536. Vetter, D. E., Liberman, M. C., Mann, J., Barhanin, J., Boulter, J., Brown, M. C., Saffiote-Kolman, J., Heinemann, S. F. and Elgoyhen, A. B. Role of alpha9 nicotinic ACh receptor subunits in the development and function of cochlear efferent innervation. *Neuron.* 1999; 23: 93-103.
537. Villablanca, A. C. Nicotine stimulates DNA synthesis and proliferation in vascular endothelial cells in vitro. *J Appl Physiol.* 1998; 84: 2089-98.
538. Villiger, Y., Szanto, I., Jaconi, S., Blanchet, C., Buisson, B., Krause, K. H., Bertrand, D. and Romand, J. A. Expression of an alpha7 duplicate nicotinic acetylcholine receptor-related protein in human leukocytes. *J Neuroimmunol.* 2002; 126: 86-98.
539. Vincler, M. and McIntosh, J. M. Targeting the alpha9alpha10 nicotinic acetylcholine receptor to treat severe pain. *Expert Opin Ther Targets.* 2007; 11: 891-7.
540. Vincler, M., Wittenauer, S., Parker, R., Ellison, M., Olivera, B. M. and McIntosh, J. M. Molecular mechanism for analgesia involving specific antagonism of alpha9alpha10 nicotinic acetylcholine receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006; 103: 17880-4.
541. Virginio, C., Giacometti, A., Aldegheri, L., Rimland, J. M. and Terstappen, G. C. Pharmacological properties of rat alpha 7 nicotinic receptors expressed in native and recombinant cell systems. *Eur J Pharmacol.* 2002; 445: 153-61.
542. Voets, T. Dissection of three Ca²⁺-dependent steps leading to secretion in chromaffin cells from mouse adrenal slices. *Neuron.* 2000; 28: 537-45.
543. Voets, T., Neher, E. and Moser, T. Mechanisms underlying phasic and sustained secretion in chromaffin cells from mouse adrenal slices. *Neuron.* 1999; 23: 607-15.
544. Vogel, W. H., Lewis, L. E. and Boehme, D. H. Phenylethanolamine-N-methyltransferase activity in various areas of human brain, tissues and fluids. *Brain Res.* 1976; 115: 357-9.
545. Vollmer, R. R., Balcita, J. J., Sved, A. F. and Edwards, D. J. Adrenal epinephrine and norepinephrine release to hypoglycemia measured by microdialysis in conscious rats. *Am J Physiol.* 1997; 273: R1758-63.

546. Vollmer, R. R., Baruchin, A., Kolibal-Pegher, S. S., Corey, S. P., Stricker, E. M. and Kaplan, B. B. Selective activation of norepinephrine- and epinephrine-secreting chromaffin cells in rat adrenal medulla. *Am J Physiol.* 1992; 263: R716-21.
547. Vollmer, R. R., Meyers-Schoy, S. A., Kolibal-Pegher, S. S. and Edwards, D. J. The role of the adrenal medulla in neural control of blood pressure in rats. *Clin Exp Hypertens.* 1995; 17: 649-67.
548. Von Euler, U. S. A specific sympathomimetic ergonein adrenergic nerve fibers (sympathin) and its relations to adrenaline and nor-adrenaline. *Acta Physiol Scand.* 1946; 12: 79-96.
549. von Ruden, L., García, A. G. and López, M. G. The mechanism of Ba(2+)-induced exocytosis from single chromaffin cells. *FEBS Lett.* 1993; 336: 48-52.
550. Wada, A., Wanke, E., Gullo, F. and Schiavon, E. Voltage-dependent Na(v)1.7 sodium channels: multiple roles in adrenal chromaffin cells and peripheral nervous system. *Acta Physiol (Oxf).* 2008; 192: 221-31.
551. Wada, A., Yanagita, T., Yokoo, H. and Kobayashi, H. Regulation of cell surface expression of voltage-dependent Nav1.7 sodium channels: mRNA stability and posttranscriptional control in adrenal chromaffin cells. *Front Biosci.* 2004; 9: 1954-66.
552. Wakade, A. R. Studies on secretion of catecholamines evoked by acetylcholine or transmural stimulation of the rat adrenal gland. *J Physiol.* 1981; 313: 463-80.
553. Wakade, A. R. and Wakade, T. D. Secretion of catecholamines from adrenal gland by a single electrical shock: electronic depolarization of medullary cell membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1982; 79: 3071-4.
554. Walsh, P. L., Petrovic, J. and Wightman, R. M. Distinguishing splanchnic nerve and chromaffin cell stimulation in mouse adrenal slices with fast-scan cyclic voltammetry. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2011; 300: C49-57.
555. Wallace, D. J., Chen, C. and Marley, P. D. Histamine promotes excitability in bovine adrenal chromaffin cells by inhibiting an M-current. *J Physiol.* 2002; 540: 921-39.
556. Wang, F., Gerzanich, V., Wells, G. B., Anand, R., Peng, X., Keyser, K. and Lindstrom, J. Assembly of human neuronal nicotinic receptor alpha5 subunits with alpha3, beta2, and beta4 subunits. *J Biol Chem.* 1996; 271: 17656-65.
557. Wang, H., Yu, M., Ochani, M., Amella, C. A., Tanovic, M., Susarla, S., Li, J. H., Wang, H., Yang, H., Ulloa, L., Al-Abed, Y., Czura, C. J. and Tracey, K. J. Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation. *Nature.* 2003; 421: 384-8.
558. Wang, H. Y., Lee, D. H., Davis, C. B. and Shank, R. P. Amyloid peptide Abeta(1-42) binds selectively and with picomolar affinity to alpha7 nicotinic acetylcholine receptors. *J Neurochem.* 2000; 75: 1155-61.
559. Wang, N., Orr-Urtreger, A. and Korszyn, A. D. The role of neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunits in autonomic ganglia: lessons from knockout mice. *Prog Neurobiol.* 2002; 68: 341-60.
560. Watanabe, Y., McKittrick, C. R., Blanchard, D. C., Blanchard, R. J., McEwen, B. S. and Sakai, R. R. Effects of chronic social stress on tyrosine hydroxylase mRNA and protein levels. *Brain Res Mol Brain Res.* 1995; 32: 176-80.
561. Weinshilboum, R. and Axelrod, J. Serum dopamine-beta-hydroxylase activity. *Circ Res.* 1971; 28: 307-15.
562. Weisstaub, N., Vetter, D. E., Elgoyhen, A. B. and Katz, E. The alpha9alpha10 nicotinic acetylcholine receptor is permeable to and is modulated by divalent cations. *Hear Res.* 2002; 167: 122-35.
563. Welsby, P., Rowan, M. and Anwyl, R. Nicotinic receptor-mediated enhancement of long-term potentiation involves activation of metabotropic glutamate receptors and ryanodine-sensitive calcium stores in the dentate gyrus. *Eur J Neurosci.* 2006; 24: 3109-18.
564. Wenger, B. W., Bryant, D. L., Boyd, R. T. and McKay, D. B. Evidence for spare nicotinic acetylcholine receptors and a beta 4 subunit in bovine adrenal chromaffin cells: studies using bromoacetylcholine, epibatidine, cytosine and mAb35. *J Pharmacol Exp Ther.* 1997; 281: 905-13.
565. West, K. A., Brognard, J., Clark, A. S., Linnoila, I. R., Yang, X., Swain, S. M., Harris, C., Belinsky, S. and Dennis, P. A. Rapid Akt activation by nicotine and a tobacco carcinogen modulates the phenotype of normal human airway epithelial cells. *J Clin Invest.* 2003; 111: 81-90.
566. Whiteaker, P., Christensen, S., Yoshikami, D., Dowell, C., Watkins, M., Gulyas, J., Rivier, J., Olivera, B. M. and McIntosh, J. M. Discovery, synthesis, and structure activity of a highly selective alpha7 nicotinic acetylcholine receptor antagonist. *Biochemistry.* 2007; 46: 6628-38.
567. Whitnall, M. H. Regulation of the hypothalamic corticotropin-releasing hormone neurosecretory system. *Prog Neurobiol.* 1993; 40: 573-629.

568. Wilkie, G. I., Hutson, P. H., Stephens, M. W., Whiting, P. and Wonnacott, S. Hippocampal nicotinic autoreceptors modulate acetylcholine release. *Biochem Soc Trans.* 1993; 21: 429-31.
569. Wilson, S. P. and Kirshner, N. The acetylcholine receptor of the adrenal medulla. *J Neurochem.* 1977; 28: 687-95.
570. Williams, M. E., Burton, B., Urrutia, A., Shcherbatko, A., Chavez-Noriega, L. E., Cohen, C. J. and Aiyar, J. Ric-3 promotes functional expression of the nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit in mammalian cells. *J Biol Chem.* 2005; 280: 1257-63.
571. Wonnacott, S. Presynaptic nicotinic ACh receptors. *Trends Neurosci.* 1997; 20: 92-8.
572. Wonnacott, S. and Barik, J. Nicotinic Acetylcholine Receptors. *Tocris Cookson.* 2007; 28: 1-20.
573. Wonnacott, S., Kaiser, S., Mogg, A., Soliakov, L. and Jones, I. W. Presynaptic nicotinic receptors modulating dopamine release in the rat striatum. *Eur J Pharmacol.* 2000; 393: 51-8.
574. Wood, J. G. and Barnett, R. J. Histochemical Demonstration of Norepinephrine at a Fine Structural Level. *J Histochem Cytochem.* 1964; 12: 197-209.
575. Wright, A. B., Norimatsu, Y., McIntosh, J. M. and Elmslie, K. S. Limited efficacy of alpha-conopeptides, Vc1.1 and Rg1A, to inhibit sensory neuron Ca current. *Eneuro.* 2015; 2.
576. Wu, P. C., Fann, M. J. and Kao, L. S. Characterization of Ca²⁺ signaling pathways in mouse adrenal medullary chromaffin cells. *J Neurochem.* 2010; 112: 1210-22.
577. Xiao, Y., Fan, H., Musachio, J. L., Wei, Z. L., Chellappan, S. K., Kozikowski, A. P. and Kellar, K. J. Sazetidine-A, a novel ligand that desensitizes alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptors without activating them. *Mol Pharmacol.* 2006; 70: 1454-60.
578. Xiao, Y. and Kellar, K. J. The comparative pharmacology and up-regulation of rat neuronal nicotinic receptor subtype binding sites stably expressed in transfected mammalian cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004; 310: 98-107.
579. Xie, J. and McCobb, D. P. Control of alternative splicing of potassium channels by stress hormones. *Science.* 1998; 280: 443-6.
580. Xu, W., Gelber, S., Orr-Urtreger, A., Armstrong, D., Lewis, R. A., Ou, C. N., Patrick, J., Role, L., De Biasi, M. and Beaudet, A. L. Megacystis, mydriasis, and ion channel defect in mice lacking the alpha3 neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999; 96: 5746-51.
581. Yang, X., Criswell, H. E. and Breese, G. R. Nicotine-induced inhibition in medial septum involves activation of presynaptic nicotinic cholinergic receptors on gamma-aminobutyric acid-containing neurons. *J Pharmacol Exp Ther.* 1996; 276: 482-9.
582. Yokotani, K., Okada, S. and Nakamura, K. Characterization of functional nicotinic acetylcholine receptors involved in catecholamine release from the isolated rat adrenal gland. *Eur J Pharmacol.* 2002; 446: 83-7.
583. Young, J. W., Crawford, N., Kelly, J. S., Kerr, L. E., Marston, H. M., Spratt, C., Finlayson, K. and Sharkey, J. Impaired attention is central to the cognitive deficits observed in alpha 7 deficient mice. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2007; 17: 145-55.
584. Yu, C. R. and Role, L. W. Functional contribution of the alpha7 subunit to multiple subtypes of nicotinic receptors in embryonic chick sympathetic neurones. *J Physiol.* 1998; 509 (Pt 3): 651-65.
585. Zhang, J., Xiao, Y., Abdrakhmanova, G., Wang, W., Cleemann, L., Kellar, K. J. and Morad, M. Activation and Ca²⁺ permeation of stably transfected alpha3/beta4 neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *Mol Pharmacol.* 1999; 55: 970-81.
586. Zhang, Y. H., Yamada, K., Hosono, T., Chen, X. M., Shiosaka, S. and Kanosue, K. Efferent neuronal organization of thermoregulatory vasomotor control. *Ann N Y Acad Sci.* 1997; 813: 117-22.
587. Zhang, Z. W., Coggan, J. S. and Berg, D. K. Synaptic currents generated by neuronal acetylcholine receptors sensitive to alpha-bungarotoxin. *Neuron.* 1996; 17: 1231-40.
588. Zheng, G., Zhang, Z., Dowell, C., Wala, E., Dwoskin, L. P., Holtman, J. R., McIntosh, J. M. and Crooks, P. A. Discovery of non-peptide, small molecule antagonists of alpha9alpha10 nicotinic acetylcholine receptors as novel analgesics for the treatment of neuropathic and tonic inflammatory pain. *Bioorg Med Chem Lett.* 2011; 21: 2476-9.
589. Zhou, Y., Nelson, M. E., Kuryatov, A., Choi, C., Cooper, J. and Lindstrom, J. Human alpha4beta2 acetylcholine receptors formed from linked subunits. *J Neurosci.* 2003; 23: 9004-15.
590. Zhou, Z. and Misler, S. Amperometric detection of stimulus-induced quantal release of catecholamines from cultured superior cervical ganglion neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995; 92: 6938-42.

591. Zhou, Z. and Neher, E. Mobile and immobile calcium buffers in bovine adrenal chromaffin cells. *J Physiol.* 1993a; 469: 245-73.
592. Zhou, Z. and Neher, E. Calcium permeability of nicotinic acetylcholine receptor channels in bovine adrenal chromaffin cells. *Pflugers Arch.* 1993b; 425: 511-7.
593. Ziegler, D. R., Cullinan, W. E. and Herman, J. P. Organization and regulation of paraventricular nucleus glutamate signaling systems: N-methyl-D-aspartate receptors. *J Comp Neurol.* 2005; 484: 43-56.
594. Ziegler, D. R. and Herman, J. P. Neurocircuitry of stress integration: anatomical pathways regulating the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis of the rat. *Integr Comp Biol.* 2002; 42: 541-51.
595. Ziegler, M. G., Kennedy, B. P. and Houts, F. W. Extra-adrenal nonneuronal epinephrine and phenylethanolamine-N-methyltransferase. *Adv Pharmacol.* 1998; 42: 843-6.
596. Zoeller, R. T., Kabeer, N. and Albers, H. E. Cold exposure elevates cellular levels of messenger ribonucleic acid encoding thyrotropin-releasing hormone in paraventricular nucleus despite elevated levels of thyroid hormones. *Endocrinology.* 1990; 127: 2955-62.
597. Zouridakis, M., Giastas, P., Zarkadas, E., Chroni-Tzartou, D., Bregestovski, P. and Tzartos, S. J. Crystal structures of free and antagonist-bound states of human alpha9 nicotinic receptor extracellular domain. *Nat Struct Mol Biol.* 2014; 21: 976-80.
598. Zuo, J., Treadaway, J., Buckner, T. W. and Fritzsche, B. Visualization of alpha9 acetylcholine receptor expression in hair cells of transgenic mice containing a modified bacterial artificial chromosome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999; 96: 14100-5.
599. Zwart, R., Broad, L. M., Xi, Q., Lee, M., Moroni, M., Bermudez, I. and Sher, E. 5-I A-85380 and TC-2559 differentially activate heterologously expressed alpha4beta2 nicotinic receptors. *Eur J Pharmacol.* 2006; 539: 10-7.
600. Zwart, R., Carbone, A. L., Moroni, M., Bermudez, I., Mogg, A. J., Folly, E. A., Broad, L. M., Williams, A. C., Zhang, D., Ding, C., Heinz, B. A. and Sher, E. Sazetidine-A is a potent and selective agonist at native and recombinant alpha 4 beta 2 nicotinic acetylcholine receptors. *Mol Pharmacol.* 2008; 73: 1838-43.

ANEXOS

Anexo I

Efecto de la α -RgIA y de la α -ArlB sobre las corrientes inducidas por ACh (I_{ACh}), Nic (I_{Nic}) y Oxo-M (I_{Oxo-M}) en células cromafines en cortes de la glándula adrenal de ratones $\alpha 9$ KO y Control

CORTES DE LA GLÁNDULA ADRENAL DE RATÓN						
Antagonistas de nAChRs ([])	Efecto (% I_{ACh})		Efecto (% I_{Oxo-M})		Efecto (% I_{Cho})	
	(nº células; nº de animales; P)		(nº células; nº de animales; P)		(nº células; nº de animales; P)	
	Control	$\alpha 9$ KO	Control	$\alpha 9$ KO	Control	$\alpha 9$ KO
RgIA (200 nM)	-30 \pm 6% (7; 2; ***)	+12% \pm 8% (10; 2; ns)		+13 \pm 10% (4; 1; ns)		+12 \pm 7% (9; 3; ns)
ArlB (50 nM)	-19 \pm 4% (3; 2; **)					-3 \pm 2% (5; 2; ns)
RgIA + ArlB	-19 \pm 2% (5; 2; ***)					

Notas: Un efecto negativo implica la disminución de la corriente mientras que un efecto positivo implica el aumento de la corriente en presencia del fármaco indicado. Dado el pequeño tamaño de las corrientes nicotínicas observado en las células cromafines de los animales $\alpha 9$ KO y la variabilidad de las respuestas de corriente a la estimulación repetida, el efecto de las toxinas puede tener signo positivo. En algunos experimentos, la α -RgIA y la α -ArlB fueron administradas simultáneamente, como se denota por el símbolo "+". Las concentraciones de ACh, Oxo-M y Cho utilizadas fueron 100 μ M, 300 μ M y 3 mM, respectivamente. *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$; ns = no significativo, respecto a la condición en ausencia de fármaco antagonista(s).

Anexo II

Efecto de la α -RglA y de la α -ArlB sobre las corrientes inducidas por ACh (I_{ACh}) en neuronas DRG de la los ganglios lumbares de la rata. Se muestra también el efecto de la α -RglA y del agonista GABA_B, baclofeno, sobre las corrientes de Ca²⁺ dependientes de voltaje (I_{Ca})

NEURONAS DRG DE LA RATA		
Antagonistas de nAChRs ([])	Efecto (% I_{ACh} (100 μ M)) (P; n° células)	Efecto (% I_{Ca}) (P; n° células)
ArlB > RglA	-34 \pm 8%*** > -35 \pm 5% (ns; 6)	
RglA > ArlB	-34 \pm 4 %*** > -39 \pm 6% (ns; 7)	
RglA (200 nM)		+8 \pm 4% (ns; 5)
Agonista GABA _B ([])	Efecto (% I_{Ca}) (n° células; P)	
Baclofeno (50 μ M)	-23 \pm 4% (***, 5)	

Notas: Un efecto negativo implica la disminución de la corriente mientras que un efecto positivo implica el aumento de la corriente en presencia del fármaco indicado. La α -RglA y la α -ArlB fueron administradas consecutivamente, como se denota por el símbolo ">". ***, P < 0,001; ns = no significativo, respecto a la condición en ausencia de fármaco(s) antagonista o del antagonista administrado inmediatamente antes.

Anexo III

Porcentajes de inhibición de la corriente inducida por ACh (I_{ACh}), Nic (I_{Nic}), u Oxo-M (I_{Oxo-M}), producidos por diferentes antagonistas nicotínicos en células cromafines de rata procedentes de animales control (CONTROL; panel superior) y sometidas a un protocolo de estrés por frío (ESTRÉS; panel inferior). Se muestran también los efectos producidos por algunos agonistas y moduladores selectivos de nAChRs así como por el agonista GABA_B, baclofeno, sobre I_{ACh} .

CONTROL (Células cromafines; 24-48 h en cultivo)			
Antagonistas de nAChRs ([I])	% inhibición I_{ACh} (100 μ M) (P; n° células)	% inhibición I_{Nic} (30 μ M) (P; n° células)	% inhibición I_{Oxo-M} (300 μ M) (P; n° células)
MII (200 nM)	30 \pm 4% (**, 20)	22 \pm 3% (**, 7)	21 \pm 8% (ns; 8)
AulB (3 μ M) > MII	66 \pm 3% (***, 12)	66 \pm 4% (**, 5)	
MLA (20 nM)	34 \pm 2% (**, 6)	28 \pm 4% (**, 7)	45 \pm 7% (*, 11)
AulB > MII	62 \pm 5%*** > 76 \pm 3%*** (12)		
MLA > MII > AulB	34 \pm 3%** > 55 \pm 4%** > 95 \pm 1%** (6)		
ArlB (50 nM)	23 \pm 4% (**, 9)	32 \pm 5% (*, 8)	17 \pm 2% (ns; 5)
RglA (200 nM)	28 \pm 4% (***, 22)	25 \pm 2% (***, 16)	48 \pm 6% (***, 48)
ArlB > RglA	28 \pm 5%* > 36 \pm 5%* (5)		
RglA > ArlB	21 \pm 5%* > 35 \pm 4%* (8)		
Agonistas y moduladores selectivos de nAChRs ([I])	I (pA)		
RJC 2403 (100 μ M)	0 (5)		
PNU282987 (30 μ M)	0 (10)		
PNU282987+ PNU120596 (1 μ M)	29 \pm 13% (10)		
Agonista GABA _B ([I])	% Inhibición I_{ACh} (100 μ M) (P; n° células)		
Baclofeno (50 μ M)	35 \pm 1% (***, 5)		

ESTRÉS (Células cromafines; 24-48 h en cultivo)			
Antagonistas de nAChRs (I)	% inhibición I _{ACh} (100 μ M) (P; n° células)	% inhibición I _{Nic} (30 μ M) (P; n° células)	% inhibición I _{Oxo-M} (300 μ M) (P; n° células)
MII (200 nM)	29 \pm 5% (*; 10)		17 \pm 6% (ns; 6)
MLA (20 nM)	54 \pm 5% (**; 12)	53 \pm 9% (***; 10) [©]	51 \pm 5% (*; 10)
AuIB (3 μ M) > MII	62 \pm 11%** > 80 \pm 4%* (4)		
MLA > MII > AuIB	41 \pm 8%* > 61 \pm 10% ** > 96 \pm 4%** (3)		
ArIB (50 nM)	35 \pm 6% (**; 13)	51 \pm 3% (***; 10)	23 \pm 7% (**; 5)
RglA (200 nM)	40 \pm 5% (**; 8)	40 \pm 3% (**; 8)	
ArIB > RglA	42 \pm 7%* > 54 \pm 7% ns (4)		
RglA > ArIB	40 \pm 8% ns > 52 \pm 8%* (4)		

Notas: Los porcentajes se obtuvieron de experimentos en los que se emplearon uno o varios antagonistas, administrados consecutivamente (protocolos de oclusión de los efectos de los antagonistas denotados con el símbolo ">"). *, P < 0,05; **, P < 0,01; ***, P < 0,001; ns = no significativo, respecto a la condición en ausencia de fármaco(s) antagonista(s) o del antagonista administrado inmediatamente antes.

Anexo IV

Porcentajes de inhibición de la corriente nicotínica inducida por la administración exógena de ACh (I_{ACh}), o por la ACh liberada por las terminaciones del nervio esplácnico espontáneamente (sEPSCs) o mediante la estimulación eléctrica de campo (EPSCs) producidos por diferentes antagonistas nicotínicos en células cromafines en cortes de la glándula adrenal de ratas control (Control) y sometidas a un protocolo de estrés por frío (Estrés). Se muestran también los efectos producidos por algunos agonistas y moduladores selectivos de nAChRs $\alpha 7$.

CORTES DE LA GLÁNDULA ADRENAL DE RATA		
Antagonistas de nAChRs ([I])	% inhibición I_{ACh} (100 μ M) (P; n° células; n° animales)	
	Control	Estrés
ArlB (50 nM)	12 \pm 3% (*; 9; 1)	25 \pm 4% (***; 8; 4)
RglA (200 nM)	20 \pm 3% (**; 20; 6)	32 \pm 7% (*; 7; 4)
RglA + ArlB		29 \pm 4% (***; 8; 4)
	% inhibición (amplitud / frecuencia) sEPSCs (P; n° células; n° animales)	
RglA + ArlB		31 \pm 0,02% (***; 4; 1) / 88 \pm 0,05% (***; 3; 1)
	% inhibición EPSCs (P; n° células; n° animales)	
RglA	28 \pm 1% (***; 4; 4)	51 \pm 7% (***; 3; 2) ^{&}
Agonistas y moduladores $\alpha 7$	I (pA)	
	Control	Estrés
PNU282987 (30 μ M)	0 (6; 2)	8 \pm 2 (6; 2)
PNU282987+ PNU120596 (1 μ M)		25 \pm 4 (6; 2)

Notas: Los porcentajes se obtuvieron de experimentos en los que se emplearon uno o varios antagonistas, administrados simultáneamente (protocolos de oclusión de los efectos de los antagonistas, denotados con el símbolo “+”). *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$; ns = no significativo, respecto a la condición en ausencia de fármaco(s) antagonista(s).

([&]) Experimento realizado en presencia de apamina